

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Malaria Aviar en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) del Parque  
Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias  
Biológicas

HÉCTOR FERNANDO CADENA ORTIZ

Quito, 2015

**CERTIFICADO**

Yo, Tjitte de Vries, Director de la disertación, CERTIFICO: Que el señor HÉCTOR FERNANDO CADENA ORTIZ ha realizado la investigación sobre el tema “Malaria Aviar en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador” de acuerdo a las normas y técnicas establecidas. Una vez concluido el trabajo, conforme con las disposiciones reglamentarias, autorizo la presentación del informe respectivo.

Quito, 1 de abril de 2015

.....

DIRECTOR

*A Ruth, Rubén,*

*Dani*

*y Elisa*

## AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y en ella a todos mis docentes, en particular a Tjitte de Vries y Jaimito Jaramillo, por inculcarme ese amor por la biología de campo. A quienes permitieron que mi pasión por la avifauna se torne en un estudio serio Elisa Bonaccorso y Tjitte de Vries.

Es necesario agradecer el apoyo al Consejo Provincial de Pichincha por permitirme trabajar dentro del BPJ, y a quienes me colaboraron enormemente dentro de éste: Ing. Ángel Orellana, Biol. Danilo Armas y todo el amable personal que allí labora.

Mi trabajo de campo no hubiese sido posible sin la ayuda de en particular de Jefferson Garcia y Judit Mateos; mis familiares: Rubén Cadena, Ximena Cadena, Daniela Cadena, David Cadena, Alexandra León y Carolina León y todos quienes me acompañaron a cada una de mis salidas, disculpen si se me pasa por alto el nombre de algun asistente: Alma Hernandez, Cristian Andrade, Cristian Poveda, Cristina Toapanta, Daniel Arias, Daniel Rivadeneira, Diana Flores, Gabriela Galarza, Ibeth Alarcón, Josue Arteaga, Maria Galbarro, Marta Quitian, Viviana Jaramillo. En especial por la grata compañía y apoyo en el campo y fuera de este de mi esposa y mis hijas.

Mi trabajo de laboratorio fue posible gracias al equipo del BioCamb en las instalaciones de la Universidad Tecnológica Indoamerica: Diana Flores, Nicolás Peñafiel y Elisa Bonaccorso. A lo largo de la preparación de mi tesis fue muy valiosos los aportes de información, comentarios y/o materiales de Elisa Bonaccorso, Javier Perez-Tris, Michael Möens, Matthew Carling, Rafael Narvaez, Anahí Paca, Gabriela Lugo, Gabriela Toscano, Javier Nolla, Juan Rivero.

Finalmente debo agradecer a Dios por el apoyo psíquico o espiritual, a mi mamá Ruth Ortiz, a mi papá Rubén Cadena y a mis abuelitas Mami-Lucy y Mamana por el apoyo

emocional y económico; también a toda mi Familia incluida la política, a mi esposa Daniela Bahamonde y mis dos hijas Intuisak e Inkudel, por la motivación diaria para seguir adelante, y a mis tutores Tjitte de Vries y Elisa Bonaccorso y a los revisores de mi tesis por el apoyo científico.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 ANTECEDENTES.....	5
3.1.1 MALARIA AVIAR.....	5
3.1.2 MALARIA AVIAR EN ECUADOR.....	7
3.1.3 EL HOSPEDERO.....	7
3.2 JUSTIFICACIÓN.....	9
3.3 OBJETIVO GENERAL.....	10
3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	11
4.2 RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y MUESTRAS GENÉTICAS.....	12
4.3 ANÁLISIS CON MICROSCOPIA Y CONTEO DE CÉLULAS.....	12
4.4 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN.....	13
4.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	14
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	16
5. RESULTADOS.....	19

5.1 PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFECCIÓN.....	19
5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	20
5.2.1 COMPARACIÓN DE LOS LINAJES DE MALARIA REPORTADOS PARA EL CHINGOLO.....	20
5.2.2 INFERENCIA FILOGENÉTICA.....	21
5.3 RELACIÓN DE INFECCIÓN CON VARIABLES.....	22
6. DISCUSIÓN.....	24
6.1 DIFERENCIAS EN MÉTODOS DE DETECCIÓN EMPLEADOS.....	24
6.2 PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFECCIÓN.....	25
6.2.1 DIFERENCIAS DE PREVALENCIA ENTRE HAEMOSPORIDIOS.....	26
6.2.2 ¿INFECCIONES MIXTAS O CO-INFECCIONES?.....	28
6.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	28
6.4 RELACIÓN DE INFECCIÓN LAS VARIABLES ESTUDIADAS.....	30
7. CONCLUSIONES.....	33
8. RECOMENDACIONES.....	34
9. LITERATURA CITADA.....	35
10. FIGURAS.....	45
11. TABLA.....	61
12. ANEXOS.....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de un haemosporidio.....	46
<b>Figura 2.</b> Ubicación geográfica del área de estudio: Bosque Protector Jerusalem.....	47
<b>Figura 3.</b> Trabajo de campo.....	48
<b>Figura 4.</b> Frotis sanguíneos de Chingolo.....	49
<b>Figura 5.</b> Gel de agarosa al 1%, fotografiado en cámara de electroforesis.....	50
<b>Figura 6.</b> El Hospedador Chingolo ( <i>Zonotrichia capensis</i> ).....	51
<b>Figura 7.</b> Condición física.....	52
<b>Figura 8.</b> Árbol filogenético.....	53
<b>Figura 9.</b> Climograma del BPJ en el periodo de muestreo.....	54
<b>Figura 10.</b> Chingolos con lesiones tipo Viruela Aviar.....	55
<b>Figura 11.</b> Ectoparásitos encontrados en el Chingolo HFC_698.....	56
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de individuos infectados según las edades del hospedero.....	57
<b>Figura 13.</b> Relación entre condición física (CF) e intensidad de infección (número de células infectadas).....	58
<b>Figura 14.</b> Intensidad de infección con relación a su cantidad de grasa corporal.....	59
<b>Figura 15.</b> Intensidad de infección con respecto a la interacción grasa-edad.....	60



## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Numero de muestras analizadas por cada método de diagnóstico de malaria

aviar.....62

**Tabla 2.** Inconsistencias entre diagnósticos por microscopía y por análisis

moleculares.....63

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Protocolo de tinción de placas con frotis sanguíneos mediante GIEMSA para poder visualizarlas en microscopio.....	65
<b>Anexo 2.</b> Protocolo de extracción de ADN con tiocianato de guanidina para muestras de sangre de aves - ExtADN01.....	66
<b>Anexo 3.</b> Composición del “coctel” de PCR y programa de amplificación.....	68
<b>Anexo 4.</b> Linajes de haemoparásitos encontradas en el Chingolo ( <i>Zonotrichia capensis</i> ), obtenidas de Genbank; con información de otros hospederos obtenida de las respectivas referencias bibliográficas.....	70
<b>Anexo 5.</b> Número de individuos capturados por especie y sus recapturas durante toda la fase de campo.....	73
<b>Anexo 6.</b> Conteo de frotis sanguíneos.....	76
<b>Anexo 7.</b> Secuencias de haemoparásitos encontrados en los Chingolos del BPJ.....	80
<b>Anexo 8.</b> Comparación de linajes de haemoparásitos encontradas en el Chingolo ( <i>Zonotrichia capensis</i> ) con las previamente reportadas en Genbank.....	82

## DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Héctor Fernando Cadena Ortiz, con C.I. 17166045-3, autor del trabajo de graduación titulado “Malaria Aviar en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de **Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador**:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE en referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la universidad

Quito, 1 de abril de 2015

Sr.....

Héctor Cadena-Ortiz

## 1. RESUMEN

La malaria aviar es una enfermedad causada por protozoos parásitos de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*. Estos parásitos infectan la sangre y otros órganos dentro de sus hospederos vertebrados, y son transmitidos por insectos del orden Diptera. Los impactos de estos protozoos en las poblaciones aviares son poco entendidos y menos aún en poblaciones silvestres del Neotrópico. Si bien estos parásitos tienen una distribución cosmopolita, han sido estudiados mayormente en zonas templadas. En este trabajo se analiza la malaria aviar en el Chingolo (*Zonotrichia capensis*), un ave abundante y ampliamente distribuida en la serranía ecuatoriana. Se emplearon dos métodos complementarios: la microscopía óptica y el análisis molecular, para determinar la infección con malaria aviar y su intensidad, y relacionarla con factores extrínsecos e intrínsecos.

Se analizaron 119 frotis sanguíneos de Chingolo, obteniéndose una prevalencia de malaria aviar 79,63% sin incluir recapturas (86 positivos; n = 108). Los frotis positivos presentaron una intensidad de 1 a 666 células infectadas en cada 10.000 células contadas. Se analizó también un total de 204 muestras de sangre utilizando amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de un fragmento de 478 pares de bases del gen de citocromo b mitocondrial; sin tomar en cuenta las recapturas por el método molecular se obtuvo una prevalencia de 65,56% (118 positivos; n = 180). Las muestras positivas fueron secuenciadas resultando una diversidad de seis linajes de protozoarios causantes de malaria, dos de *Haemoproteus* y cuatro de *Plasmodium*, cuatro de estos son nuevos linajes, no reportados antes en ningún hospedero. Considerando todos los individuos detectados como infectados por cualquiera de ambos métodos, sin incluir recapturas, el valor de la prevalencia de malaria aviar para el Chingolo es de 74,72% (n = 182).

La prevalencia de malaria aviar del Chingolo en el área de estudio, el Bosque Protector Jerusalem, resulta bastante alta en comparación a otros estudios en este mismo hospedero en otros países. La edad es la variable que más se relaciona con la cantidad de infección por malaria en el Chingolo, mientras que las variables precipitación del mes de muestreo, condición física, grasa, y la interacción entre edad y grasa son las que explican de manera significativa la variación en la intensidad de infección.

**Palabras clave:** Bosque seco, *Haemoproteus*, linajes, Malaria aviar, Neotrópico, *Plasmodium*, *Zonotrichia capensis*.

## 2. ABSTRACT

Avian malaria is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* and *Haemoproteus*. These parasites infect the blood and other organs within their vertebrate hosts, and are transmitted by insects of the order Diptera. The impacts of these protozoa in avian populations are poorly understood, especially in wild populations of the Neotropics. While these parasites have a cosmopolitan distribution, they have been studied mostly in temperate zones. This study analyzed avian malaria infections in the Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*), an abundant and widely distributed bird of the Ecuadorian highlands. Two complementary methods, optical microscopy and molecular analysis, were used to determine avian malaria infection and intensity, and relate it with extrinsic and intrinsic factors.

A total of 119 Rufous-collared Sparrow blood smears were analyzed, yielding a prevalence of avian malaria 79.63% (positive 86; n = 108), excluding recaptures. Positive smears showed an intensity of 1–666 infected cells in 10,000 cells counted. A total of 204 blood samples were also analyzed using amplification by Polymerase Chain Reaction of a fragment of 478 bp of the mitochondrial cytochrome b gene; a prevalence of 65.56% (positive 118; n = 180) was obtained the molecular method, excluding recaptures. Positive samples were sequenced resulting in six malaria-causing lineages, two of *Haemoproteus* and four of *Plasmodium*; four of these strains have not been reported before in any host. Considering all individuals identified as infected by either method, excluding recaptures, the value of the prevalence of avian malaria for Rufous-collared Sparrow is 74.72% (n = 182).

The avian malaria prevalence in the Rufous-collared Sparrow in the study area, the Bosque Protector Jerusalem, is high compared to other studies on the same host in other

countries. Age is the variable more related to malaria infection, while precipitation, sampling month, physical condition, fat, and the interaction between age and fat are the variables that have a greater effect on the intensity of infection.

**Keywords:** Avian malaria, Dry forest, *Haemoproteus*, linages, Netropics, *Plasmodium*, *Zonotrichia capensis*.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 ANTECEDENTES

##### 3.1.1 MALARIA AVIAR

El término malaria aviar hace referencia a enfermedades causadas por parásitos, protozoos del phylum Apicomplexa, orden Haemosporida (Pérez-Tris *et al.*, 2005; Valkiūnas, 2005). Estos son transmitidos por vectores e infectan la sangre y otros órganos dentro de sus hospederos las aves (Pérez-Tris *et al.*, 2005) (ver ciclo de vida Fig. 1). Tradicionalmente se reconocen como parásitos de malaria las especies del género *Plasmodium*, sin embargo, últimamente, la definición ha sido ampliada para considerar los linajes de *Haemoproteus* (Pérez-Tris *et al.*, 2005). Estos dos géneros de protozoos junto con *Leucocytozoon*, otro haemosporidio, están entre los parásitos sanguíneos más estudiados en las aves (Valkiūnas, 2005; Pérez-Tris, 2009).

La relación entre los parásitos sanguíneos y sus impactos en las poblaciones aviarias es poco entendida (LaPointe *et al.*, 2012). Marzal (2005) señala que los parásitos sanguíneos tienen baja patogenicidad en poblaciones naturales mientras que causan enfermedades y muerte en aves en cautividad. En este sentido, se han visto desde sutiles pero importantes efectos en las estrategias vitales de hospederos, hasta ningún efecto debilitador (Marzal, 2005).

Existen numerosos reportes de individuos con infecciones patógenas agudas con *Plasmodium*. Sin embargo, los informes de epidemias son poco frecuentes y generalmente asociados con aves en cautividad, en colecciones zoológicas o en asociaciones anormales huésped-parásito después de la introducción de parásitos o mosquitos vectores a islas remotas (Atkinson *et al.*, 2008), como las del archipiélago de Hawaii, cuando la



introducción de *Culex quinquefasciatus* vector de *P. relictum*, afectó fuertemente a los mieleros (Aves: Drepanidinae) (Freed *et al.*, 2005). Entre los síntomas descritos para ciertas aves infectadas con *Plasmodium* están: anemia, letargo, anorexia, plumas erizadas, hematocritos reducidos en más de 50%, diarrea, aumento de células blancas de la sangre (Atkinson *et al.*, 2008). En infecciones crónicas, se presentan convulsiones y parálisis parciales o totales, piernas edematosas e incluso muerte (Atkinson *et al.*, 2008). *Plasmodium* es calificado más virulento que otros haemosporidios; sus vectores son mosquitos (Culicidae), moscas de la arena (Phlebotomidae) y jejenes (Ceratopogonidae) (Valkiūnas, 2005).

Por otro lado *Haemoproteus*, es considerado uno de los parásitos de sangre más comunes y generalizados de las aves silvestres; sin embargo, su importancia potencial como agente de enfermedad en las poblaciones de aves silvestres es en gran parte desconocido (Atkinson *et al.*, 2008). Entre los síntomas estudiados en ciertas especies se listan: cojera, pesos y tasas de crecimiento más bajos que aves sanas, pérdida de equilibrio y dificultad para caminar, anemia, anorexia y elevación del número de linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos (Atkinson *et al.*, 2008). Los vectores de *Haemoproteus* son jejenes (Ceratopogonidae) y moscas hipobosidas (Hippoboscidae) (Valkiūnas, 2005).

Los parásitos aviares tienen una distribución cosmopolita y una gran prevalencia (Atkinson y van Ripper III, 1991). Se ha determinado, principalmente en zonas templadas, que la prevalecía de enfermedades infecciosas como la malaria aviar, varía marcadamente a lo largo del tiempo (Altizer *et al.*, 2006). Por ejemplo, se han visto picos en la prevalencia de malaria a finales de verano y otoño cuando aumentan las poblaciones de vectores y de hospederos más susceptibles, como juveniles (Cosgrove *et al.*, 2008). Bensch *et al.* (2007) sugieren que factores extrínsecos como la distribución de vectores, podrían

influenciar directamente. Las causas de la variación de la prevalencia y el nivel de parasitemia de malaria aviar, han sido relacionadas a diferentes factores extrínsecos e intrínsecos, sin embargo continúan siendo poco entendidas (Knowles *et al.*, 2011).

### 3.1.2 MALARIA AVIAR EN ECUADOR

La presencia de parásitos sanguíneos en aves del Neotrópico está relativamente inexplorada (de Vries *et al.*, 2014), lo que inicialmente se le podría atribuir a la alta diversidad de aves en esta zona (Munro *et al.*, 2009) y al poco esfuerzo de investigación en relación al que se ha realizado en las zonas templadas (Valkiūnas, 2005; Möens, 2010). En Ecuador, esta infección ha sido estudiada principalmente en Galápagos (e.g., Whiteman *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2013), mientras que pocos son los trabajos en la región continental, incluyendo la región andina (Munro *et al.*, 2009; Escallón *et al.*, 2012; Harrigan *et al.*, 2014), la vertiente amazónica de los Andes, en las zonas bajas de Morona-Santiago (Möens, 2010) y la cuenca del río Zamora (Paca, 2011). El presente trabajo, en conjunto con el de Bahamonde (2014) es el primer estudio realizado en los bosques secos ecuatorianos y, más específicamente, en los bosques secos del callejón interandino, zona que a más de estar poco estudiada, es muy amenazada por la expansión agrícola, ganadera y urbana (Aguirre *et al.*, 2006; Albuja, 2011).

### 3.1.3 EL HOSPEDERO

El Chingolo (*Zonotrichia capensis*) o también conocido como Gorrión Americano, pertenece a la familia Emberizidae (Rising *et al.*, 2011). Tiene una amplia distribución desde el sur de México hasta la Patagonia (Ortiz y Carrión, 1991; de Vries, 2000), con 25 subespecies reconocidas hasta la fecha (Rising *et al.*, 2011). En Ecuador, es común a lo largo de la Sierra; su rango altitudinal va desde 1500 a 3500 m.s.n.m. (Ridgely y Greenfield, 2006) y aparentemente se estaría expandiendo hacia las bajuras orientales (de

Vries, 2000; Buitrón-Jurado, 2011). Su éxito como comensal del hombre le da una amplia ventaja numérica sobre cualquiera de sus congéneres (Ortiz y Carrión, 1991), siendo una de las aves no silvícolas más comunes de la Sierra (Ridgely y Greenfield, 2006).

La dieta del Chingolo es variada e incluye semillas, insectos, lombrices, pedazos de frutas, follaje y migas de pan, entre otros desperdicios caseros (Ortiz y Carrión, 1991). Su sistema social es monogámico y territorial; su puesta es de 2–3 huevos, incubados en menos de dos semanas y el mismo tiempo toma el desarrollo de los polluelos, los que son atendidos por ambos adultos (Ortiz y Carrión, 1991). Rising *et al.* (2011) mencionan que a lo largo de su distribución el Chingolo cría en todo momento del año. En Ecuador se vio en Las Caucheras, Napo (~2100 m), que la reproducción del Chingolo se da durante todo el año (Class *et al.*, 2011). Sin embargo, en altitudes mayores, en el páramo de Papallacta, se ha visto un pico marcado de reproducción de septiembre a diciembre (Moore *et al.*, 2005).

La prevalencia de infección en esta especie ha demostrado ser relativamente alta en diversos estudios. En el páramo de Papallacta, se encontró que el Chingolo fue el único de 11 especies muestreadas en presentar infección por tres géneros de parásitos sanguíneos: *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (Munro *et al.*, 2009). Otros reportes con infección de malaria aviar en el Chingolo vienen de: Brasil (Bennett y de Souza Lopes, 1980; Lacorte *et al.*, 2013), Chile (Merino *et al.*, 2008), Colombia (González *et al.*, 2014), Costa Rica (Young *et al.*, 1993), Perú (Jones *et al.*, 2013), Uruguay y Guyana (Durrant *et al.*, 2006).

Por sus hábitos comensales con el hombre, los que podrían aumentar el contacto con reservorios de la enfermedad (LaPointe *et al.*, 2012), los antecedentes de infección en estudios previos, y su abundancia natural (Ridgely y Greenfield, 2006), el Chingolo es una especie clave en el estudio de la malaria aviar. Dentro del Bosque Protector Jerusalem

(BPJ) estudios a la par revisaron las relaciones entre varias aves hospederas en este Bosque y sus parásitos (Bahamonde, 2014). Sin embargo, el estudio específico del Chingolo, el ave más numerosa en la zona, permite relacionar la infección por malaria con factores extrínsecos (precipitación) e intrínsecos (edad, grasa y condición física), con mayor poder estadístico. Estos resultados, a su vez, contribuyen a la comprensión de la relación parásito-hospedero en un ave Neotropical, en un ecosistema de marcada estacionalidad climática (Guerrón *et al.*, 2005) y alta influencia de actividad humana (Freile y Santander, 2005), como lo es el BPJ.

### 3.2 JUSTIFICACIÓN

El estudio de enfermedades vinculando parásitos y hospederos, permite entender mejor la dinámica de las poblaciones. Para obtener datos estadísticamente más fiables se requiere un número alto de hospederos, por ello el presente trabajo se enfoca en la especie aviar más abundante de la zona de estudio, el Chingolo. Con el mismo propósito de tener datos completos se emplearon dos metodologías complementarias para analizar la malaria aviar: microscopía y técnicas moleculares.

Los resultados generados en el presente trabajo servirán de base para nuevos estudios. A futuro, se pueden ejecutar proyectos similares, con parásitos causantes de malaria, para otras especies y hacer análisis comparativos, junto con los ya realizados, para encontrar patrones de prevalencia de la malaria y comprender mejor la distribución de los linajes de parásitos.

En el Ecuador son contados los trabajos que se han realizado en malaria aviar y en particular en el valle interandino. Por esta razón es importante conocer qué parásitos están en esta zona, en qué cantidad y si han sido encontrados previamente en otras regiones, para

empezar a elucidar patrones sobre la ecología e incluso la biogeografía de estos protozoarios.

### **3.3 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la infección por hemoparásitos causantes de malaria aviar (*Plasmodium* y *Haemoproteus*) en los Chingolos (*Zonotrichia capensis*) y las variables asociadas a la presencia e intensidad de las infecciones en el Bosque Protector Jerusalem.

### **3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1) Determinar el nivel de prevalencia de infección por hemoparásitos que causan la malaria aviar (*Plasmodium* y *Haemoproteus*) en los Chingolos del Bosque Protector Jerusalem, utilizando tanto microscopía óptica como métodos moleculares.

2) Determinar la identidad de los linajes de haemosporidios que infectan a la población de Chingolos del Bosque Protector Jerusalem, utilizando métodos moleculares.

3) Determinar si diferentes variables (precipitación, edad, grasa, condición física, entre otras), están asociadas a la presencia e intensidad de infección por malaria aviar, utilizando métodos estadísticos comparativos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDIO

El Bosque Protector Jerusalem (BPJ) se ubica al norte de la ciudad de Quito (00° 00' 05" N, 78° 21' 18" O; Fig. 2), con una extensión de 1.110 ha ubicadas dentro de la subcuenca del río Guayllabamba, parroquia de Malchinguí, provincia de Pichincha (MAG, 1989). Es el único bosque seco tropical de altura protegido en Ecuador (Carvajal-Campos, 2009), declarado como tal desde 1989 (MAG, 1989). Su ecosistema está clasificado como “Bosque y arbustal semideciduo del norte de los valles” (MAE, 2013). En este se evidencia la dominancia de árboles de algarrobo (*Acacia macracantha*), sobre los cuales se desarrolla abundante vegetación epífita, presencia abundante de cactus de varios géneros y un amplia área con sembríos de plantas nativas y cítricos principalmente (obs. pers.).

Según Carvajal-Campos (2009) la zona presenta estacionalidad marcada, seca en mayo–agosto y lluviosa en septiembre–abril; la estación seca tiene una precipitación media aproximada de 125 mm y la estación lluviosa una precipitación media aproximada de 360 mm. La temperatura tiene poca variación durante el año, con media anual 19° C a la sombra (Carvajal-Campos, 2009); todas estas variables se las estimó de datos colectados 2000–2005 en las estaciones La Victoria y Malchinguí del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). Para relacionar los datos de presencia e intensidad de infecciones de malaria con la pluviosidad, para el periodo de muestreo del presente trabajo, se obtuvieron datos climatológicos en el INAMHI, de la estación climática La Victoria (00°03'36" S, 78°12'2" O; 2262 m), la estación activa más cercana al área de estudio.

## 4.2 RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y MUESTRAS GENÉTICAS

Se escogieron cuatro sitios fijos dentro del BPJ: dos a lo largo de una franja cortafuegos (Zona 1 00° 00' 17,4" N, 78° 21 '34,7" O; 2349 m y Zona 3 00° 00' 21,4" N, 78° 21 '22,7" O; 2372 m), uno dentro del Vivero forestal (Zona 2 00° 00' 08,8" N, 78° 21' 25,3" O; 2294 m) y el último en el sendero turístico “Huellas del lobo” (Zona 4 00° 00' 08,8" N, 78° 21' 29,8" O 2304 m). Desde diciembre 2012 a junio 2013 cada sitio fue visitado en orden secuencial, sumando al final seis visitas a cada sitio.

En cada sitio se colocaron siete redes de neblina, de 12 × 3 m cada una, para la captura de aves. Para estandarizar el esfuerzo de muestreo, las redes siempre se abrieron el primer día de corrido desde 6h00 a 18h00 y el segundo día de 6h00 a 12h00; completando un esfuerzo de muestreo durante todo el estudio de 3924 red/hora/visita (7 redes/18 horas/24 visitas). Solo en pocas ocasiones se cerraron las redes por motivos de lluvia y en dos ocasiones se mantuvieron las redes abiertas una hora extra (hasta las 19h00).

A cada ave se la marcó con anillos plásticos de colores y código numérico único, para identificar si se lo volvía a capturar, seguidamente se tomó medidas morfométricas y peso, se obtuvo muestras de sangre (menos de 1 cc por individuo) vía de la yugular o de la vena branquial. Con una gota (5–20 µl) se preparó un frotis y el resto se conservó en alcohol al 96% para análisis moleculares (Fig. 3).

## 4.3 ANÁLISIS CON MICROSCOPIA Y CONTEO DE CÉLULAS

Para determinar el nivel de infección, los frotis fueron fijados con etanol absoluto el mismo día de su elaboración y fueron teñidos con solución GIEMSA (Waldenström *et al.*, 2004; Möens, 2010; Anexo 1; Fig. 4). Se revisaron fotografías en literatura especializada

(e.g. Valkiūnas, 2005) de los diferentes tipos celulares; a continuación se inspeccionó todo el frotis a bajo aumento (40×) para determinar la presencia de infecciones y posteriormente en 100× se contó el número de células infectadas, policromatófilos (eritrocitos inmaduros) y eritrocitos sanos. Esto se hizo hasta obtener un total de 10.000 células por placa, como se ha estandarizado en trabajos anteriores (Waldenström *et al.*, 2004); en este proceso se empleó un promedio de 90 minutos por placa.

Se contaron 10.000 células en 18 frotis por mes, cada uno de estos frotis perteneció a individuos de primeras capturas, es decir excluyendo recapturas. Los frotis de individuos muestreados los primeros días de junio de 2013 fueron incluidos con los del mes de mayo de 2013, para mantener el mismo esfuerzo de muestreo por mes. El número seleccionado de placas por mes (18), se debió al mes con menos capturas, marzo, cuando se obtuvo frotis de 21 individuos de Chingolo, tres de estos eran individuos recapturados de meses anteriores. Adicionalmente se contaron las células de 11 frotis de individuos recapturados que contaban con frotis analizados de la primera captura.

#### **4.4 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN**

Las muestras de sangre conservadas en alcohol al 96% se emplearon para amplificación de ADN utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la extracción del ADN genómico total, se siguió un protocolo de lisis con proteinasa K, precipitación de proteínas con tiocianato de guanidina, precipitación de ADN con isopropanol, y lavado con etanol (M. Fujita, no publicado; Anexo 2).

Para el proceso de PCR se utilizó la metodología de Cosgrove *et al.* (2008) (que incluye la de Bensch *et al.* [2000] y la de Waldenström *et al.* [2004]). Se amplificó un fragmento de 478 pb del gen de citocromo b (cytb) mitocondrial, con el propósito de



detectar infecciones con *Haemoproteus* y *Plasmodium* y diferenciar linajes de estos. El uso *cytb* está altamente estandarizado, ya que por sus regiones conservadas que flanquean regiones variables del ADN, puede ser amplificado en una gran diversidad de linajes de malaria (Waldenström *et al.*, 2004). Los cebadores empleados fueron HaemF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') y HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') (Waldenström *et al.*, 2004).

Las reacciones de PCR se prepararon en volúmenes totales de 25 µl (5 µl de ADN genómico, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Buffer PCR 1X, 0,4 mM dNTPs, 0,6 µM cebador directo, 0,6 µM cebador reverso y 1,25 U Platinum Taq polimerasa [InvitroGen®]). La PCR se efectuó en un termociclador con las siguientes condiciones: 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C, 45 segundos a 72 °C y 10 minutos a 72 °C (Waldenström *et al.*, 2004; Anexo 3).

Para determinar cuáles muestras estaban infectadas con malaria aviar, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis y tinción con SYBR® Safe (Invitrogen) en gel de agarosa al 1% (Fig. 5). Para confiabilidad de los resultados, las muestras negativas fueron re-amplificadas a partir de los productos de la primera PCR con las mismas condiciones pero con solo 20 ciclos. Las muestras positivas fueron purificadas con ExoSAP-IT® (Affymetrix) y enviadas a secuenciar en la empresa Macrogen (Korea del Sur) empleando los mismos cebadores utilizados durante el PCR.

#### 4.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

El proceso de acoplamiento y edición de secuencias de ADN de parásitos (*Haemoproteus* y *Plasmodium*) se examinó por coincidencias entre las dos cadenas de nucleótidos, corrigiendo errores en la interpretación automática del cromatograma, en el

programa Geneious 5.1.7 (Biomatters Ltd.). Para poder comparar los linajes de parásitos encontrados en este trabajo en el contexto de secuencias de otros linajes, se realizó una búsqueda en MalAvi (Bensch *et al.*, 2009) y GenBank (Benson *et al.*, 2013) de linajes que se han reportado infectan al Chingolo (Anexo 4). Adicionalmente, para dar un contexto regional, se incluyeron secuencias publicadas de haemopárasitos en Ecuador (Harrigan *et al.*, 2014).

El alineamiento de todas las secuencias compiladas se realizó de forma automática en Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), y luego se supervisó y ajustó en Mesquite (Maddison y Maddison, 2010). De igual forma se ajustó el alineamiento de acuerdo la longitud de la mayoría de secuencias (las publicadas por Harrigan *et al.*, 2014) para linajes de haemosporidios de Ecuador. Este procedimiento permitió obtener una matriz de 43 secuencias de 456 caracteres cada una.

Se obtuvo el mejor modelo de evolución en jModelTest 2.16 (Posada, 2008), siendo este el modelo GTR + I + G, o sea el modelo general de tiempo reversible (GTR por sus siglas en inglés), y que toma en cuenta la distribución de sitios invariables (I) y la distribución (gamma o G) de los sitios variables. Con este modelo se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud en Garli (Zwickl, 2008), con 5 búsquedas. También se realizó un análisis bayesiano en MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) corriendo 2 millones de generaciones, muestreando cada 1000 árboles y con *burnin* de 250, obteniendo 1750 árboles con los que se calculó el árbol de 50% de consenso de mayoría. Sobre este árbol se acoplaron los valores de máxima verosimilitud para clados comunes en los dos árboles y se enraizó al árbol con la secuencias de *Leucocitozoon* de Harrigan *et al.* (2014).

Igual que en muchos otros trabajos sobre haemoparásitos (e.g.: Bensch *et al.*, 2004; Reullier *et al.*, 2006; Ricklefs *et al.*, 2005), en el presente se considera un linaje

evolutivamente independiente a aquella secuencia única que se diferencia de otra en al menos una base. Bajo este criterio, aquellas secuencias que no coincidieron en su totalidad con los linajes archivados en MalAvi (Bensch *et al.*, 2009) ni GenBank (Benson *et al.*, 2013) se los identifica como nuevos.

#### 4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para determinar si diferentes variables están asociadas a la presencia e intensidad de infección por malaria aviar, se siguieron los siguientes procedimientos. En primer lugar se definió un conjunto de variables independientes. Se tomó en cuenta la precipitación en base a datos obtenidos del INAMHI, dada en mm, para ello se contaba con datos tanto del mes de captura y del mes anterior a la captura (que también podría tener un efecto sobre la infección). Para evitar que estas dos variables (precipitación del mes anterior y precipitación del mes de captura) fueran redundantes en análisis posteriores, se aplicó una correlación de Pearson. Dado que la correlación entre ambas variables fue moderada ( $r = 0,39$ ), se utilizó solo la precipitación del mes en análisis posteriores. La segunda variable ambiental fue “zona”, que indicaba el sitio de muestreo donde se había capturado al individuo (una de las cuatro previamente definidas en 4.2); la inclusión de esta variable buscaba capturar la variación de microclimas y microhábitats entre las diferentes zonas.

Entre las variables intrínsecas, “edad” se categorizó según observaciones tomadas en campo en juveniles y adultos, categorizando como adultos todos aquellos individuos que presentaron plumaje bien definido de adulto y sin comisuras notorias en el pico (Fig. 6). La “condición física” fue calculada como los residuales de la regresión lineal entre el peso corporal y la longitud del tarso (Jakob *et al.*, 1996; Fig. 7). La “grasa”, fue estimada por observación directa en el campo, clasificada en tres categorías (ausente, leve y

moderada). También se tomó en cuenta la presencia de lesiones posiblemente ocasionadas por viruela aviar (pox), de acuerdo a la presencia o no de lesiones inflamadas o con costras en la piel expuesta, membranas mucosas de la boca o tracto respiratorio superior y/o dedos faltantes en patas (Atkinson *et al.*, 2005; Van Riper III y Forrester, 2007). Para tomar en cuenta los diferentes efectos que podrían causar diferentes géneros de haemosporidios, incluimos la variable “género”, (*Haemoproteus* o *Plasmodium*) de acuerdo al diagnóstico molecular, del género que esté infectando al individuo hospedero y finalmente “linaje”, dado por la identificación particular del parásito infectante de acuerdo al análisis filogenético (Benson *et al.*, 2013).

La variable dependiente que representa la presencia de infección se definió como “infección general” y tomó dos valores: infectado (1, por cualquiera de los dos métodos [microscopía o PCR]) y no infectado (0). Para analizar el efecto de las variables independientes sobre la infección general, se aplicó un modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés). Esto se hizo utilizando una distribución logística para la variable dependiente (individuos infectados o no) y una función de enlace Logit, por tratarse de una variable binaria (Quinn y Keough, 2002).

Se aplicó también un segundo análisis con las mismas variables independientes, pero teniendo como variable dependiente la intensidad de infección (número de células infectadas sobre 10.000 células contadas). Se aplicó también un modelo lineal generalizado, pero en este caso la distribución de la variable dependiente fue Poisson (por tratarse de conteos de células) y la función de enlace fue de identidad (Quinn y Keough, 2002).

Todos los análisis se realizaron en el programa STATISTICA (StatSoft, 2007). Por limitaciones en los grados de libertad de los GLM, se procedió a aplicar modelos que tomaran en cuenta las dos variables continuas (precipitación del mes y condición física) o

una de ellas, con combinaciones de hasta dos de las cinco variables categóricas (zona, edad, grasa, pox, género y linaje). El ajuste de diferentes modelos a los datos fue evaluado tomando en cuenta la verosimilitud de cada modelo y escogiendo el modelo con el mayor valor de verosimilitud.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFECCIÓN**

A lo largo del periodo de muestreo dentro del BPJ se tomaron datos de 916 aves agrupadas en 36 especies (Anexo 5). El Chingolo fue la especie más abundante con 226 capturas en red, de estos 25 individuos fueron recapturas, para una tasa de recaptura de 11,47 %. Solo hubo una segunda recaptura, la cual sucedió en un mes diferente al de la primera recaptura (Anexo 6).

En total, se analizaron 119 frotis sanguíneos de Chingolo, incluyendo 108 primeras capturas y 11 recapturas. En los 108 frotis de individuos capturados por primera vez (18 por mes), 86 fueron diagnosticados como positivos para la infección (79,63%), con 1 a 666 células infectadas en cada 10.000 células contadas (Tabla 1). Los 11 frotis contados de individuos recapturados (Anexo 6) muestran similares resultados a sus capturas iniciales: dos individuos resultaron negativos por microscopía y el resto, nueve individuos, con presencia de células infectadas en ambos casos.

En total 204 muestras (incluyendo primeras capturas y recapturas) fueron analizadas molecularmente, 134 resultaron positivas para la amplificación de *cytb*; excluyendo las recapturas se contó con 180 individuos de los cuales 118 resultaron positivos para infección (Tabla 1), para una prevalencia de 65,56%.

Con ambos métodos se obtuvieron falsos negativos (Tabla 2). De los 22 frotis negativos por microscopía, dos (HFC 159 y HFC 328), fueron detectados positivos molecularmente y dos (HFC 567 y HFC 699), no contaron con suficiente cantidad de muestra para extracción de ADN. En el caso de los 18 restantes, el resultado negativo fue corroborado molecularmente. En contraste, 19 individuos (incluida una recaptura)

detectados como negativos molecularmente, fueron positivos por microscopía, con 2 a 110 células infectadas (promedio 34,21).

En total se cuenta con 182 individuos de Chingolo, sin recapturas, analizados por uno o ambos métodos; de estos, 118 individuos fueron positivos por diagnóstico molecular y 18 (19 menos una recaptura) fueron detectados como negativos molecularmente, pero positivos por microscopía. Este balance resultó en 136 individuos positivos, por uno o ambos métodos, es decir una prevalencia de malaria aviar de 74,72% en la población de Chingolos del BPJ durante diciembre 2012 a junio 2013.

La prevalencia de cada género de parásito en los 180 individuos analizados molecularmente (sin recapturas) es de 42,22% (76 individuos) para *Haemoproteus* y 18,33% (33 individuos) para *Plasmodium*. Nueve individuos, que representan el 5% del total de analizados, mostraron infección positiva pero su linaje no pudo ser identificado a nivel de género, debido a la mala calidad de la secuenciación que impidió tener una secuencia consenso.

## 5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

### 5.2.1 COMPARACIÓN DE LOS LINAJES DE MALARIA REPORTADOS PARA EL CHINGOLO

En las 134 muestras positivas para la amplificación de *cytb* con los cebadores HaemF y HaemR2, 81 individuos presentaron un linaje de *Haemoproteus* similar al previamente reportado KC480265 (Jones *et al.*, 2013; Anexo 4); dos individuos presentaron un linaje nuevo de *Haemoproteus* (llamado aquí HaemALT); 37 individuos presentaron un linaje de *Plasmodium* idéntico a JN819334 (Archer *et al.*, datos no

publicados), para el fragmento analizado. Finalmente, cinco individuos presentaron tres linajes nuevos de *Plasmodium* (llamados aquí PlasALT [dos individuos], Plas1pb [dos individuos] y Plas2pb [un individuo]). Como se mencionó antes, nueve individuos sí presentaron amplificación, es decir, fueron positivos para la infección por *Haemoproteus* o *Plasmodium*, pero sus secuencias no pudieron ser consensuadas por lo que no se identificó el linaje de haemosporidio presente. En resumen, se amplificaron seis linajes de haemoparásitos en el Chingolo (Anexo 7), dos de estos con 100% de similitud a linajes ya reportados en Genbank (KC480265, JN819334) y el resto (HaemALT, PlasALT, Plas1pb y Plas2pb) fueron nuevos linajes que tienen de 99% de similitud con linajes previamente reportados (Anexo 8).

### 5.2.2 INFERENCIA FILOGENÉTICA

En la Figura 8 se presenta el árbol filogenético construido con secuencias de *cytb* de los parásitos hemosporidios del Chingolo en el BPJ. En este se observan claramente los clados de *Haemoproteus* y *Plasmodium*, unidos con el mayor soporte (100/1,00 *bootstrap*/probabilidad posterior bayesiana [pp]). Tres de los cuatro linajes de *Plasmodium* encontrados en este trabajo (JN819334, Plas1pb y Plas2pb) se agrupan en un solo clado (sin soporte de *bootstrap* y 0,75 pp), mientras que el cuarto (PlasALT), está en un clado más externo, hermano al resto de las secuencias de *Plasmodium*. Los dos linajes de *Haemoproteus* (KC480265, HaemALT) caen en un solo clado conformado también por otros dos linajes (EF153648, EF153652) previamente reportados para el Chingolo en Chile (Merino *et al.*, 2008).



### 5.3 RELACIÓN DE INFECCIÓN CON VARIABLES

Los datos de precipitación y temperatura obtenidos de la estación climatológica La Victoria (Fig. 9), indican que para el periodo de muestreo la temporada seca fue de diciembre a enero (precipitación mensual = 17,5 y 16,7 mm; respectivamente) y la temporada lluviosa se dio de febrero a mayo (98,7; 32,5; 56,1; y 104,5 mm). La temperatura presentó poca variación con una media mensual para el periodo de muestreo de 17,27° C, siendo los meses más fríos febrero y mayo (16,8 ° C) y el mes más cálido enero (17,9 ° C).

Las cuatro zonas muestreadas dentro del BPJ estaban separadas entre sí por al menos 600 m, no diferían mayormente en su estructura, pero cabe recalcar que las zonas 1 y 3, las más alejadas de las facilidades turísticas, fueron las que menos capturas de Chingolos presentaron (zona 1, 30 capturas; zona 3, 46); en contraste con la zona 2 con 88 capturas y la zona 4 con 62. Para los análisis de presencia de infección (infección general) se contó con 139 individuos adultos y 36 juveniles; mientras que para las comparaciones de intensidad se contó con 64 adultos y 15 juveniles; de toda la temporada de muestreo. En el campo se evidenciaron 18 individuos de Chingolo con presencia de lesiones tipo viruela aviar (8,14%;  $n = 221$ ), principalmente con lesiones inflamadas en patas (Fig. 10). También se detectó la presencia de larvas parasitando al Chingolo (Fig. 11) pero únicamente en tres individuos adultos, por lo que este dato no fue considerado como una variable.

En la relación de las diferentes variables (definidas en 4.6) con la infección general, el modelo que mejor se ajustó a los datos fue el que incluyó a las variables precipitación del mes, condición física, Zona, Edad y la interacción Zona-Edad; este modelo presentó un valor de log verosimilitud de -84,0068 y la variable que mejor explica la infección general

es Edad ( $p = 0,000892$ ). A la par hubo mayor porcentaje de infectados entre los individuos adultos (80,6%,  $n = 139$ ) que entre juveniles (47,2%,  $n = 36$ ) (Fig. 12).

Por otro lado, el modelo que mejor se ajustó a los datos de intensidad fue el que incluyó las variables precipitación del mes, condición física, edad, grasa y la interacción edad-grasa; este modelo presentó un valor de log verosimilitud de -24153,9 y las variables que mejor explicaron la intensidad fueron condición física ( $p = 0,000025$ ), grasa ( $p = 0,010434$ ) y la interacción edad-grasa ( $p = 0,007628$ ). En los Chingolos analizados encontramos que a mayor condición física menos número de células infectadas ( $R^2 = 0,0292$ ; Fig. 13). En cuanto a grasa en los individuos que no la evidenciaron (ausente) se obtuvo un promedio de células infectadas de 85,40% ( $n = 40$ ), en los de leve 81,55% ( $n = 33$ ) y en los de moderada 48,69% ( $n = 13$ ) (Fig. 14). Finalmente, en cuanto a la relación entre intensidad de infección y la interacción grasa-edad, se puede interpretar que independientemente de la edad, los individuos con grasa moderada presentan baja intensidad de infección; mientras que, independientemente de la grasa, los individuos adultos muestran bajas intensidades de infección (Fig. 15).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 DIFERENCIAS EN MÉTODOS DE DETECCIÓN EMPLEADOS

Con ambos métodos de detección, microscopía y molecular, se obtuvieron falsos negativos; en las 117 muestras, con recapturas incluidas ( $n = 11$ ), que fueron analizadas tanto por microscopía como molecularmente, dos fueron diagnosticadas como negativas por microscopía, pero positivas por PCR. Un total de 19 muestras diagnosticadas negativas por PCR, fueron positivas por microscopía con un promedio de 34,21 células infectadas y rango de 2–110. Sin embargo, es importante resaltar que el método molecular fue también suficientemente sensible para detectar la infección en 12 muestras cuyos frotis presentaron un conteo de menos de 10 células en 10.000 células contadas.

La mayoría de métodos basados en PCR para detectar parásitos haemosporidios tienen mayor sensibilidad que los métodos tradicionales de microscopía (Waldenström *et al.*, 2004). Sin embargo ambos métodos pueden arrojar falsos positivos (Richard *et al.*, 2002); por lo que es altamente recomendable una análisis conjunto. Además cada método arroja información complementaria. La microscopía permite determinar la intensidad de infección y mientras que el PCR permite identificar molecularmente los linajes parasíticos.

No se analizaron todas las muestras con ambos métodos, principalmente porque los análisis con microscopía toman mucho tiempo, lo cual es uno de sus inconvenientes más significativos, junto con la baja probabilidad de detectar muestras con bajo nivel de infección (Richard *et al.*, 2002). Cabe resaltar que tuvimos buena detección con microscopía por el alto número de células contadas 10.000. Mientras que podemos atribuir los falsos negativos con PCR a fallas metodológicas en la extracción de ADN (Richard *et al.*, 2002) o errores a lo largo del proceso de ensamble de la PCR.

## 6.2 PREVALENCIA E INTENSIDAD DE INFECCIÓN

La población del Chingolo en el BPJ presentó una prevalencia de malaria aviar de 74,72% (n = 182). Este es el valor más alto encontrado en este hospedero hasta el momento, considerando los estudios que son comparables. Por ejemplo en Brasil se reporta una prevalencia de 19,02% (n = 163; Bennett y de Souza Lopes, 1980), en Perú 26,63% (n = 184; Jones *et al.*, 2013) y en Colombia 24,06% (n = 133; González *et al.*, 2014).

Estudios del Chingolo en Ecuador encontraron que en una población en Papallacta, Napo, expresan altos niveles de testosterona durante un prolongado periodo que no coincide con el de subida en la tasa de reproducción (Moore *et al.*, 2004). Ambos factores suprimen la eficiencia del sistema inmune, lo que haría al Chingolo más vulnerable a las infecciones de malaria aviar en varias temporadas por diferentes factores (Moore *et al.*, 2004). Sin embargo en otra población de Chingolos también en Napo, en Las Caucheras, no fue evidente una subida en la tasa de reproducción en ninguna fecha, sugiriendo que el Chingolo es atemporal para la reproducción en este sitio (Class *et al.*, 2011). Este también sería el caso para la población del BPJ, ya que en todos los meses de muestreo encontramos individuos juveniles; por lo tanto habría individuos sensibles a ser infectados todo el tiempo.

A pesar de que a nivel global se ha visto que aves de zonas templadas tienen altas tasas de infección en comparación con aves de las mismas familias en zonas tropicales (Ricklefs, 1992); la prevalencia de malaria aviar del Chingolo en el BPJ es también alta en comparación a un hospedero de zonas templadas, *Zonotrichia leucophrys*, para el cual el Chingolo es filogenéticamente cercano (Zink y Blackwell 1996). Blanco *et al.* (2001)

encuentran en *Zonotrichia leucophrys*, muestreados en dos localidades al norte de México, únicamente infecciones con *Haemoproteus coatneyi* con una prevalencia de 27,40%.

Esta alta prevalencia de malaria podría ser también explicada por la ubicación geográfica del BPJ cercana al ecuador. Esta idea se basa en la evidencia de mayor prevalencia de malaria aviar a medida que se disminuye la latitud, sugiriéndose la composición de los vectores en cada área, como principal causa (Durrant *et al.*, 2006 y Merino *et al.*, 2008), ya que estos también aumentan en abundancia y diversidad mientras que las localidades se acercan más al ecuador (Nunn *et al.*, 2005). También se ha relacionado altitudes medias, como en la que se encuentra el BPJ, con altas prevalencias (Paca, 2011; Jones *et al.*, 2013).

#### 6.2.1 DIFERENCIAS DE PREVALENCIA ENTRE HAEMOSPORIDIOS

Una mayor prevalencia de *Haemoproteus* (42,22%) que de *Plasmodium* (18,33%) en la muestra analizada (n = 180), es congruente con la encontrada en otros países tropicales. En Brasil, en 163 Chingolos muestreados, 24 (14,72%) estaban infectados con *Haemoproteus* y 7 (4,29%) con *Plasmodium* (Bennett y de Souza Lopes, 1980). En Colombia, en 133 individuos, 25 (18,80%) tuvieron *Haemoproteus* y 7 (5,26%) *Plasmodium* (González *et al.*, 2014). En Perú en 184 especímenes hubo 47 (25,54%) con *Haemoproteus* y 2 (1,09%) con *Plasmodium* (Jones *et al.*, 2013).

Es evidente en todos los estudios anteriores y en el presente, que existe una mayor prevalencia de *Haemoproteus* frente a la de *Plasmodium* en el Chingolo. Se sabe que *Haemoproteus* es el género de haemosporidio más común y generalizado en aves silvestres (Atkinson *et al.*, 2008). Igualmente, se conocen más especies de este género, ya que se han descrito 132 especies morfológicas de *Haemoproteus* mientras que para *Plasmodium* solo

38 (Valkiūnas, 2005). Cabe recalcar que muchas de estas especies morfológicas pueden ser especies crípticas que representen más linajes (Martinsen *et al.*, 2006). No se conoce completamente los efectos de estos dos géneros en las poblaciones silvestres y es difícil conocer su letalidad pues no es común encontrar las aves silvestres muertas (Atkinson *et al.*, 2008).

En otros hospederos hay información contradictoria con respecto a las prevalencias de *Haemoproteus* y *Plasmodium* en una misma población. White *et al.* (1978) menciona, en base a revisión bibliográfica, igualmente dominancia de *Haemoproteus* (7.4%) frente a *Plasmodium* (1.9%) para aves en el Neotrópico. Valkiūnas (2005) menciona valores similares con prevalencias de 7.1% para *Haemoproteus* y 1.6% para *Plasmodium*. Sin embargo, Durrant *et al.* (2006) en Uruguay y Guyana, encuentran una mayor prevalencia de *Plasmodium* (16,05%) ante *Haemoproteus* (5,80%). De igual forma, Lacorte *et al.* (2013) encuentran en Brasil 84% de prevalencia para *Plasmodium* y 16% para *Haemoproteus*, pero estos mismos autores encuentran que muchos estudios realizados en las comunidades de aves de América del Sur y del Norte muestran una mayor prevalencia de *Haemoproteus*.

La principal causa asociada a esta diferencia de prevalencia entre géneros de malaria aviar, es posiblemente la abundancia diferente de vectores en cada área (Valkiūnas, 2005; Ishak *et al.*, 2008). Pese a haber un estudio detallado de entomofauna en el BPJ (Subía, 2014), este no encontró vectores de malaria aviar. Sin embargo, es evidente que los hay, pero se requieren metodologías específicas para capturarlos. El conocer la diversidad y abundancia de vectores sin duda ayudará a entender estas diferencias de prevalencia entre haemosporidios, sin embargo aún se siguen describiendo nuevas especies de vectores de malaria, de los cuales no se conoce por completo su distribución (Ruiz-Lopez *et al.*, 2012).

### 6.2.2 ¿INFECCIONES MIXTAS O CO-INFECCIONES?

De apenas nueve secuencias no se pudo identificar el género, debido a una mala calidad de la amplificación lo que impidió tener una secuencia consenso. En los cromatogramas de varias de estas secuencias se evidenció la presencia de dobles picos, lo que en otros estudios ha sido identificado como infección mixta (Marzal *et al.*, 2013; Harrigan *et al.*, 2014), es decir que un individuo está infectado de dos linajes diferentes de malaria aviar. Se ha hipotetizado que las infecciones mixtas podrían traer efectos perjudiciales al hospedero; sin embargo los efectos reales de estas infecciones permanecen ampliamente desconocidos (Marzal *et al.*, 2013). De igual forma se ha visto que las infecciones mixtas se presentan en bajas tasas y no son consideradas en los análisis (Cosgrove *et al.*, 2008). De ser el caso que estas nueve muestras sean infecciones mixtas, apenas representan el 5% de prevalencia, pero se requeriría un análisis más profundo para considerarlas como tales.

### 6.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

En el presente estudio se encontró que la población de Chingolos del BPJ está siendo infectada por seis linajes causantes de malaria aviar; dos de *Haemoproteus*, muy emparentados entre ellos, ubicándose en un solo clado (Fig. 8) y cuatro de *Plasmodium*, tres de estos ubicados en un solo clado y el cuarto en otro clado, hermano a todo el género *Plasmodium* para nuestra muestra. Harrigan *et al.* (2014) sugieren que los clados de *Plasmodium* podrían ser más diversos, ya que encontraron que linajes de este género infectan a numerosos hospederos en los Andes. Precisamente el linaje más numeroso de *Plasmodium* en este estudio coincide con el linaje JN819334 previamente encontrado en *Tangara icterocephala*, en Costa Rica (Archer *et al.*, datos no publicados).

En el Anexo 4 se puede evidenciar que linajes que infectan al Chingolo han sido encontrados en otros hospederos principalmente del orden Passeriformes (Furnariidae, Tyrannidae, Tityridae, Thamnophilidae, Paraulidae, Turdidae, Troglodytidae, Vireonidae, Thraupidae, Icteridae) y apenas dos no passeriformes (Psittacidae, Trochilidae). Esto puede deberse a un sesgo de muestreo en los hospederos, en redes de neblina, que es como se ha capturado a las aves en todos los trabajos revisados y es una técnica por la cual se atrapan principalmente Passeriformes. También se podría especular una especialización de los linajes parasitantes a Passeriformes. Otros trabajos también vislumbran especificidad de ciertos linajes; Valkiūnas (2005) menciona que *Haemoproteus* puede ser específico a nivel de familia; Merino *et al.* (2008) mencionan especificidad a nivel de la familia Emberizidae por parte de linajes de *Haemoproteus* y finalmente Harrigan *et al.* (2014) encuentran linajes limitados geográficamente a Sudamérica.

En el Chingolo en Costa Rica reportan infección con *Haemoproteus coatneyi*, determinado solo morfológicamente (Young *et al.*, 1993). La especie morfológica *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) *coatneyi* fue descrita por Burry-Caines y Bennett (1992), encontrada en *Zonotrichia albicollis* de Canada. Posteriormente esta especie morfológica fue reportada parasitando diferentes passerinos, incluidos Chingolos en Chile, Brasil y Venezuela (Valkiūnas, 2005). Para el presente trabajo, las secuencias obtenidas de *Haemoproteus coatneyi* H\_DENCOR01\_Haem\_coatneyi (MalAvi) y EU254550\_Haem\_coatneyi (GenBank), son iguales entre ellas, pero ninguno de los linajes obtenidos en el presente estudio, se asocia con estas secuencias (Fig. 8). De estos resultados, se podría sugerir que *Haemoproteus coatneyi* no está presente en los Chingolos del BPJ. Posiblemente muchos casos reportados de esta especie en Chingolos son especies crípticas, morfológicamente similares, pero en realidad representan otra especie molecular



(Martinsen *et al.*, 2006). Sin embargo, también podría haber infecciones raras con este linaje que no pudieron ser detectadas con el tamaño muestral analizado.

Jones *et al.* (2013) mencionan que un linaje de *Haemoproteus*, el más común entre Chingolos de Perú (KC480265; M. Carling com. pers.), podría estar asociado con *Haemoproteus coatneyi*, en base a los reportes de esta especie morfológica en el mismo hospedero en Valkiūnas (2005). Sin embargo, en el árbol filogenético obtenido en el presente trabajo, ninguno de los dos linajes de *Hemoproteus* reportados por Jones *et al.* (2013) se relaciona cercanamente con el clado de *Haemoproteus coatneyi*. No obstante, sí hay una relación no evidenciada por Jones *et al.* (2013) con respecto a linajes de *Haemoproteus* que infectan Chingolos: el linaje KC480265 (Perú, Jones *et al.*, 2013) coincide en un mismo clado con el linaje EF153652 reportado por Merino *et al.* (2008) en Chile. Probablemente de igual forma que pasa los linajes HFC\_HaemALT y HFC\_KC480265\_Haem\_Peru, que antes de ajustar su longitud para su análisis, presentaban al menos una diferencia en los pares de bases, una secuencia más larga podría evidenciar diferencias entre los linajes de Perú y Chile.

#### **6.4 RELACIÓN DE INFECCIÓN LAS VARIABLES ESTUDIADAS**

Las causas de la variación de la prevalencia a nivel de población o especie (o infección a nivel individual) y el nivel de parasitemia de malaria aviar, continúan poco entendidas (Knowles *et al.*, 2011). En el presente estudio, el modelo lineal generalizado evidenció que la edad del hospedero es una variable significativa para explicar la infección por malaria aviar. También se encontró que la variación observada en intensidad de infección puede ser explicada por la condición física, la grasa y la interacción entre la grasa y la edad del hospedero.

Hubo mayor porcentaje de Chingolos adultos infectados que de juveniles, pese a que los individuos juveniles son más susceptibles de contraer la infección por tener sistemas inmunes más débiles que los adultos (Lozano y Lank, 2003); pero también ciertos linajes de haemosporidios pueden causar alta mortandad en estadios no adultos, reflejándose en una prevalencia de infección menor (Davidar y Morton, 1993). Los adultos a su vez por tener más tiempo de vida han tenido más tiempo de exposición a los vectores y por ende podrían estar presentes en mayor porcentaje con infecciones crónicas (Wood *et al.*, 2007).

No hubo un estudio que relacione específicamente la cantidad de grasa con la intensidad de infección en malaria aviar; sin embargo las variables cantidad de grasa y condición física, están relacionadas, ya que para estimar la condición física se empleó la longitud del tarso y el peso corporal, y este último está relacionado directamente con la cantidad de grasa. Se puede suponer que individuos con baja condición física tienen poca o nada de grasa y viceversa. A la par se ha visto que aves infectadas con haemosporidios presentan baja condición física (Marzal *et al.*, 2013). Por ejemplo en *Turdus merula* se vio una disminución progresiva de la condición corporal asociada con una mayor prevalencia de haemosporidios (Hatchwell *et al.*, 2001). Esto es coherente con los resultados encontrados en el presente, de que a mayor condición física menor intensidad de infección. Sin embargo, en *Zonotrichia leucophrys* no se encontró relación entre el tamaño ni la condición corporal con respecto a la intensidad de infección ni diferencias de esta con respecto a la edad o sexo del hospedero (Blanco *et al.*, 2001).

Otros ejemplos de relaciones opuestas incluyen el trabajo de Bennett *et al.* (1988) quienes encontraron una correlación positiva entre la masa corporal e infección por haemosporidios en 3,739 passeriformes en Canadá. También Schultz *et al.* (2010) en un estudio a largo plazo en un solo hospedero (*Ploceus capensis*), no encontraron impactos

negativos en masa o condición corporal de este, ni de cualquier efecto estacional significativo en la masa corporal, con relación a la prevalencia de haemosporidos, y sugieren que un factor más importante para la masa corporal fue la disponibilidad de alimentos constante durante todo el año.

En los Chingolos muestreados del BPJ, se encontró que los individuos adultos tenían menor intensidad de infección en comparación a los juveniles. Precisamente esa es la norma: la intensidad de infección disminuye a medida que avanza la edad, por adquisición de inmunidad (Sol *et al.*, 2003); pero también se puede encontrar lo contrario, posiblemente por procesos de inmunosenescencia entre individuos que mantienen infecciones crónicas (Knowles *et al.*, 2011).

No hay un estudio que relacione la grasa con la edad de los Chingolos, sin embargo esta especie al no ser un ave migratoria ni vivir en una zona de cambios estacionales bruscos, la estrategia de almacenamiento de grasa en el Chingolo corresponde a hacerlo en temporadas de reproducción y desarrollo (Blem, 1976). Aunque se trata de una especulación, es posible que los Chingolos del BPJ cuando llegan a edad adulta, independientemente de su cantidad de grasa acumulada, sobreviven con infecciones crónicas de baja intensidad; mientras que para los juveniles la cantidad de grasa sí podría ser un factor influyente y en esta edad a mayor cantidad de grasa menor intensidad de infección.

## 7. CONCLUSIONES

El Chingolo por su amplia distribución y su abundancia natural puede servir como una especie modelo en parasitología aviar. Moore *et al.* (2004) ya menciona a esta especie como buena candidata para estudiar adaptaciones de hormonas y comportamiento.

Los métodos moleculares permitieron identificar seis linajes de haematozoos infectando al Chingolo. Aunque no es usual que los parásitos se consideren como parte de la riqueza de biodiversidad (Harrigan *et al.*, 2014), documentar la diversidad y prevalencia de parásitos en una región es muy importante, pues es el primer paso para comprender las causas de las enfermedades y como las especies hospederas podrían ser impactadas (Echaubard *et al.*, 2014).

Para el presente estudio el método de microscopía resultó ser muy eficiente, por el alto número de células contadas. Sin embargo sigue siendo aconsejable para la detección de *Haemoproteus* y *Plasmodium* el uso de microscopía y también detección por PCR, un estudio con ambos métodos tiene resultados complementarios y más fiables.

En la población de Chingolos del BPJ se vio que la infección por malaria aviar podría responder de acuerdo a la edad del hospedero. También se encontró que la intensidad de infección se ve afectada por la condición física, la grasa y la interacción entre la grasa y la edad del hospedero. Continúa siendo necesario el análisis de otras variables por ejemplo la altitud y la latitud, y cuál es el nivel de prevalencia de malaria en este hospedero en otras poblaciones. Para futuros trabajos que busquen entender la dinámica de la malaria en una escala espacial, ya se cuenta con un punto central de partida, el BPJ, porque se encontró alta prevalencia de malaria, siendo un área con una ubicación cercana al ecuador y con una altitud media.

## 8. RECOMENDACIONES

Ecuador se ubica en el tercer puesto de diversidad entre los países del Neotrópico y cuarto a nivel global (Freile y Santander, 2005). Se conocen para el país más de 1 640 especies de aves (Ridgely y Greenfield, 2001), por ende debe abarcar un número igualmente grande de protozoarios parásitos causantes de la malaria aviar, por lo que se recomienda darle más atención a este grupo de animales en estudios de diversidad.

Es necesario profundizar en la búsqueda de linajes de haemosporidios, tanto dentro del área investigada como a lo largo del país, en transectos altitudinales y latitudinales. Esto permitirá visualizar cual es la distribución de estos linajes, lo que es básico para el desarrollo de otros campos como la ecología y la biología de la conservación. De igual modo, un análisis más minucioso de los linajes de haemosporidios que incluyan secuencias genéticas más grandes y confrontación morfológica con microscopía óptica, permitirá vislumbrar especies crípticas y definir nuevas especies.

Para una comprensión completa de la dinámica de la enfermedad es necesario estudiar a los vectores. Poca o nula información ha sido generada sobre la diversidad de insectos que transmiten la malaria a las aves en la región. Durante la fase de campo de este trabajo se colectaron varias moscas hipobósidas, que pueden ser el inicio para un muestreo más amplio y un análisis de estas.

## 9. LITERATURA CITADA

Aguirre, Z.M., Kvist, L.P. y Sánchez, O. 2006. Bosques secos en Ecuador y su diversidad. En Moraes, R., Øllgaard, B., Kvist, L.P., Borchsenius, F. y Balslev, H. (eds). Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.

Albuja, L. (ed.). 2011. Biodiversidad de los valles secos interandinos del Ecuador. Escuela Politécnica Nacional, Quito.

Altizer, S., Dobson, A., Hosseini, P., Hudson, P., Pascual, M. y Rohani, P. 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters* 9: 467-484.

Atkinson, C.T., Lease, J.K., Dusek, R.J. y Samuel, M.D. 2005. Prevalence of pox-like lesions and malaria in forest bird communities on leeward Mauna Loa Volcano, Hawaii. *The Condor* 107(3): 537-546.

Atkinson, C.T., Thomas, N.J. y Hunter, B. 2008. Parasitic Diseases of Wild Birds. *Parasitic Diseases of Wild Birds*, Wiley-Blackwell, Iowa.

Atkinson, C.T. y van Riper III, C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. En Loye, J. E. y Zuk, M. (eds.). *Bird-Parasite Interactions* pp.19-48. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

Bahamonde, D. 2014. Prevalencia de Malaria Aviar en las aves comunes del Parque Recreacional-Bosque Protector Jerusalem, Pichincha, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Bennett, G.F. y de Souza Lopes, O. 1980. Blood parasites of some birds from São Paulo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 75: 117-134.

Bennett, G.F., Caines, J.R. y Bishop, M.A. 1988. Influence of blood parasites on the body mass of passeriform birds. *Journal of Wildlife Diseases* 24: 339-343.

Bensch, S., Hellgren, O. y Pérez-Tris, J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353-1358.

Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J. y Hellgren, O. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58: 1617-1621.

Bensch, S., Sterjman, M., Hasselquist, D., Östman, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H. y Torres, R. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society Series B* 267: 1583-1589.

Bensch, S., Waldenström, J., Jonzén, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D. y Hasselquist, D. 2007. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *Journal of Animal Ecology* 76: 112-122.

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. y Sayers, E.W. 2013. GenBank. *Nucleic acids research* 41(D1): D36-D42.

Blanco, G., Rodríguez-Estrella, R., Merino, S. y Bertellotti, M. 2001. Effects of spatial and host variables on hematozoa in white-crowned sparrows wintering in Baja California. *Journal of Wildlife Diseases* 37(4): 786-790.

Blem, C.R. 1976. Patterns of lipid storage and utilization in birds. *American Zoologist* 16(4): 671-684.

Buitrón-Jurado, G. 2011. Interesting distributional records of Amazonian birds from Pastaza, Ecuador. Bull. B.O.C. 131: 241-248.

Burphy-Caines, J.R. y Bennett, G.F. 1992. The Haemoproteidae (Apicomplexa: Haemosporina) of the avian families Fringillidae and Emberizidae s. l. Can. J. Zool. 70: 1149-1160.

Carvajal-Campos, A. 2009. Reproducción y Dieta de la Lagartija Andina *Stenocercus guentheri* (Squamata: Iguania) en el Parque Protector Jerusalem. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Class, A.M., Wada, H., Lynn, S.E., y Moore, I.T. 2011. The timing of life-history stages across latitudes in Zonotrichia sparrows. The Condor, 113(2): 438-448.

Cosgrove, C.L., Wood, M.J., Day, K.P. y Sheldon, B.C. 2008. Seasonal variation in Plasmodium prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. Journal of Animal Ecology 77: 540-548.

Davidar, P., Morton, E.S. 1993. Living with parasites: Prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. The Auk 110(1): 109-116.

Durrant, K.L., Beadell, J.S., Ishtiaq, F., Graves, G.R., Olson, S.L., Gering, E., Peirce, M.A., Milensky, C.M., Schmidt, B.K., Gebhard C. y Fleischer, C. 2006. Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. Ornithol. Monogr. 60: 98-111.

Echaubard, P., Leduc, J., Pauli, B., Chinchir, V.G., Robert, J. y Lesbarrères, D. 2014. Environmental dependency of amphibian-ranvirus genotypic interactions: evolutionary perspectives on infectious diseases. Evolutionary Applications 7(7): 723-733.



Escallón, C., Weinstein, N.M., Bonaccorso, E., Wojtenek, W. y Moore, I.T. 2012. Elevation, testosterone, and parasites in a tropical sparrow. Emerging Issues Conference. Shepherdstown, West Virginia.

Freed, L.A., Cann, R.L., Goff, M.L., Kuntz, W.A. y Bodner, G.R. 2005. Increase in avian malaria at upper elevation in Hawaii. *The Condor* 107: 753-764.

Freile, J.F. y Santander, T. 2005. Áreas importantes para la conservación de las aves en Ecuador. Aves & Conservación (Corporación Ornitológica del Ecuador), BirdLife International, Conservación Internacional y Ministerio de Ambiente de Ecuador. Quito.

González, A.D., Matta, N. E., Ellis, V.A., Miller, E.T., Ricklefs, R.E. y Gutiérrez, H.R. 2014. Mixed Species Flock, Nest Height, and Elevation Partially Explain Avian Haemoparasite Prevalence in Colombia. *PloS one* 9(6): 1-9.

Guerrón, M., Orellana, A., Loor, A. y Zambrano, J. 2005. Studies in the protected dry forest Jerusalem. *Lyonia* 8: 5-18.

Harrigan, R.J., Sedano, R., Chasar, A.C., Chaves, J.A., Nguyen, J.T., Whitaker, A. y Smith, T.B. 2014. New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. *Evolutionary applications* 7(7): 799-811.

Hatchwell, B.J., Wood, M.J., Anwar, M.A., Chamberlain, D.E. y Perrins, C.M. 2001. The haematozoan parasites of Common Blackbirds *Turdus merula*: associations with host condition. *Ibis* 143: 420-426.

Huelsenbeck, J.P., y Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.

Ishak, H.D., Dumbacher, J.P., Anderson, N.L., Keane, J.J., Valkiūnas, G., Haig, S.M., Tell, L.A. y Sehgal, R.N. 2008. Blood parasites in owls with conservation implications for the spotted owl (*Strix occidentalis*). PLoS one 3(5): e2304.

Jakob, E.M., Marshall, S. D. y Uetz, G.W. 1996. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. Oikos 77: 61-67.

Jones, M.R., Cheviron, Z.A. y Carling M.D. 2013. Spatial Patterns of Avian Malaria Prevalence in *Zonotrichia capensis* on the Western Slope of the Peruvian Andes. Journal of Parasitology 99:903-905.

Knowles, S.C., Wood, M.J., Alves, R., Wilkin, T.A., Bensch, S. y Sheldon, B.C. 2011. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. Molecular Ecology 20(5): 1062-1076.

Lacorte, G.A., Félix, G.M.F., Pinheiro R.R.B., Chaves, A.V., Almeida-Neto, G., Neves, F.S., Leite, L.O., Santos, F.R. y Braga, É.M. 2013. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. PLoS ONE 8: 1-9.

LaPointe, D.A., Atkinson, C.T. y Samuel, M.D. 2012. Ecology and conservation biology of avian malaria. Annals of the New York Academy of Sciences 1249: 211-226.

Levin, I.I., Zwiers P., Deem, S.L., Geest, E.A., Higashiguchi, J.M., Iezhova, T.A., Jiménez-Uzcátegui, G., Kim, D.H., Morton J.P., Perlut, N.G., Renfrew, R.B., Sari, E.H.R., Valkiūnas, G. y Parker, P.G. 2013. Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and evidence for arrival via migratory birds. Conserv Biol 27:1366-1377.

Lozano, G. A. and Lank, D. B. 2003. Seasonal trade-offs in cell-mediated immunosenescence in ruffs (*Philomachus pugnax*). Proc. R. Soc. Lond. B. 270: 1203-1208.

Maddison, W.P., y Maddison, D.R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Versión 3.01. <http://mesquiteproject.org>

MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador). 2013. Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Subsecretaría de Patrimonio Natural, Quito.

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 1989. Acuerdo Ministerial No. 244, publicado en el Registro Oficial No. 227 de 6 de julio de 1989. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Quito.

Martinsen, E.S., Paperna, I. y Schall, J.J. 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. Parasitology 133(03): 279-288.

Marzal, A. 2005. Senescencia, parasitismo, Inmunidad y éxito reproductor en el Avión Común (*Delichon urbica* Linneo 1758). Tesis Doctoral, Departamento de Ciencias Morfológicas, Biología celular y animal, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

Marzal, A., Asghar, M., Rodríguez, L., Reviriego, M., Hermosell, I.G., Balbontín, J., Garcia-Longoria, L., de Lope, F. y Bensch, S. 2013. Co-infections by malaria parasites decrease feather growth but not feather quality in house martin. Journal of Avian Biology 44(5): 437-444.

Merino, S., Moreno, J., Vásquez, R.A., Martínez, J., Sánchez-Monsálvez, I., Estados, C.F., Ippi, S., Sabat, P., Rozzi, R. y Mcgehee, S. 2008. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. Austral Ecology 33: 329-340.

Möens, M.A.J. 2010. Diversity and specificity of avian malaria parasites in a lowland tropical rainforest in southeast Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander, España.

Moore, I.T., Bonier, F., y Wingfield, J.C. 2005. Reproductive asynchrony and population divergence between two tropical bird populations. *Behavioral Ecology* 16:755–762.

Moore, I., Wada, H., Perfito, N., Busch, D.S., Hahn, T.P. y Wingfield, J.C. 2004. Territoriality and testosterone in an equatorial population of rufous-collared sparrows, *Zonotrichia capensis*. *Animal Behaviour* 67: 411-420.

Munro, H.J. Martin, P.R., Moore, I.T. y Bonier, F. 2009. Blood parasites in adult and nestling birds in the Ecuadorian Andes. *Ornitología Neotropical* 20: 461-465.

Nunn C.L., Altizer S.M., Sechrest W. y Cunningham A.A. 2005. Latitudinal gradients of parasite species richness in primates. *Divers. Distrib.* 11: 249-56.

Ortiz, F.I. y Carrión, J.M. 1991. Introducción a las aves del Ecuador. Fecodes, Quito, Ecuador.

Paca, A. 2011. Prevalencia de malaria en colibrís (Trochilidae) en los bosques montanos del sur de Ecuador. Tesis de Maestría. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander, España.

Pérez-Tris, J. 2009. La parasitología ecológica en la era de la genética molecular. *Ecosistemas* 18: 52-59.

Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Waldenström, J. y Bensch, S. 2005. What are malaria parasites? *Trends in Parasitology* 21: 209-211.

Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution* 25(7): 1253-1256.

Quinn, G.P. y Keough, M.J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press.

Remsen, J.V., Cadena, C.D., Jaramillo, A., Nores, M., Pacheco, J.F., Pérez-Emán, J., Robbins, M.B., Stiles, F.G., Stotz, D.F. y Zimmer, K.J. 2014. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. [www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html](http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html) (accesado en mayo de 2014)

Reullier, J., Pérez-Tris, J., Bensch, S. y Secondi, J. 2006. Diversity, distribution and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. *Molecular Ecology* 15: 753-763.

Richard, A.F, Sehgal, R.N.M., Jones, H.I. y Smith, T.B. 2002. A Comparative Analysis of PCR-Based Detection Methods for Avian Malaria. *J. Parasitol.* 88: 819-822.

Ricklefs, R. E., Swanson, B., Fallon, S.M., Martinez, A., Scheuerlein, A., Gray, J. y Latta, S.L. 2005. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecol. Monogr.* 75: 543-559.

Ricklefs, R.E. 1992. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 4722-4725.

Ridgely, R.S. y Greenfield, P.J. 2001. *The Birds of Ecuador*, Cornell University Press, Ithaca.

Rising, J., Jaramillo, A., Copete, J.L., Madge, S. y Ryan, P. 2011 Rufous-collared Sparrow *Zonotrichia capensis*. *En: del Hoyo, J., Elliott, A. Christie, D.A. (eds.) Handbook of the birds of the world, vol. 16*. Barcelona: Lynx Edicions.

Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., McKeon, S.N., Levin, D.M., Quiñones, M.L., Póvoa, M.M. y Linton, Y.M. 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors. *Parasit Vectors* 5: 44.

Schultz, A., Underhill, L.G., Earlé, R.A. y Underhill, G. 2010. Infection prevalence and absence of positive correlation between avian haemosporidian parasites, mass and body condition in the Cape Weaver *Ploceus capensis*. *Ostrich* 81(1): 69-76.

Sol, D., Jovani, R., Torres, J. 2003. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia* 135: 542–547.

StatSoft, C.S.S. 2007. STATISTICA. Versión 6.1. StatSoft Inc., Tulsa.

Subía, M.A. 2013. Comparación entomofaunistica de tres sitios del Bosque Protector Jerusalén durante estaciones seca y lluviosa. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25 (24): 4876–4882.

Valkiūnas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton.

Van Riper, C. y Forrester, D.J. Avian Pox. 2007. *En*: Thomas, N.J., Hunter, D.B. y Atkinson, C.T. (eds.) *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Pub.

de Vries, T. 2000 ¿Por qué al Gorrión europeo no le gusta Quito? Nuestra Ciencia 2: 36-37. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, PUCE, Quito, Ecuador.

de Vries, T., Toscano, G. y Sánchez, P. 2014. Las aves y sus parásitos. Nuestra Ciencia 16: 7-10. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, PUCE, Quito, Ecuador.

Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist D. y Ostman, O. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. Journal of Parasitology 90:191-194.

White, E.M., Greiner, E.C., Bennett, G.F. y Herman, C.M. 1978. Distribution of the haematozoa of Neotropical birds. Rev. Biol. Trop. 26: 43-102.

Whiteman, N.K., Goodman, S.J., Sinclair, B.J., Walsh, T., Cunningham, A.A., Kramer, L.D. y Parker P.G. 2005. Establishment of the avian disease vector *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) on the Galápagos Islands, Ecuador. Ibis 147 (4): 844-847.

Wood, M.J, Cosgrove, C.L., Wilkin, T.A., Knowles, S.C.L, Day, K.P., Sheldon, B.C. 2007. Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. Molecular Ecology 16: 3263–3273.

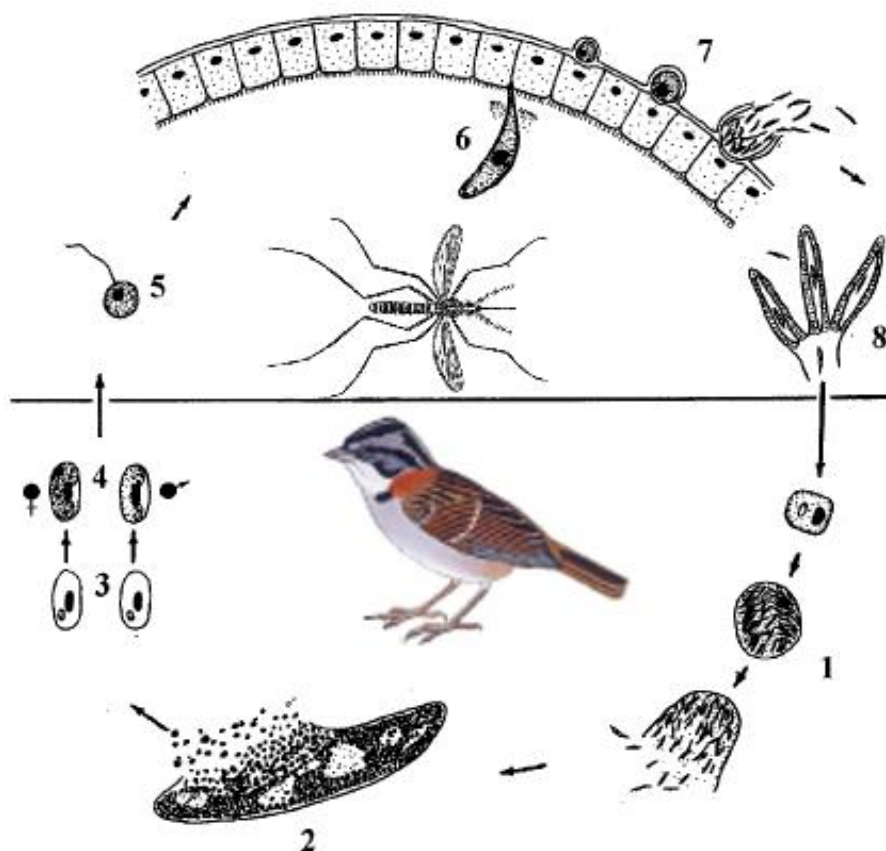
Young, B.E., Garvin, M.C. y McDonald, D.B. 1993. Blood parasites in birds from Monteverde, Costa Rica. Journal of Wildlife Diseases 29: 555-560.

Zink, R.M. y Blackwell, R.C. 1996. Patterns of allozyme mitochondrial DNA, and morphometric variation in four sparrow genera. Auk 113: 59-67.

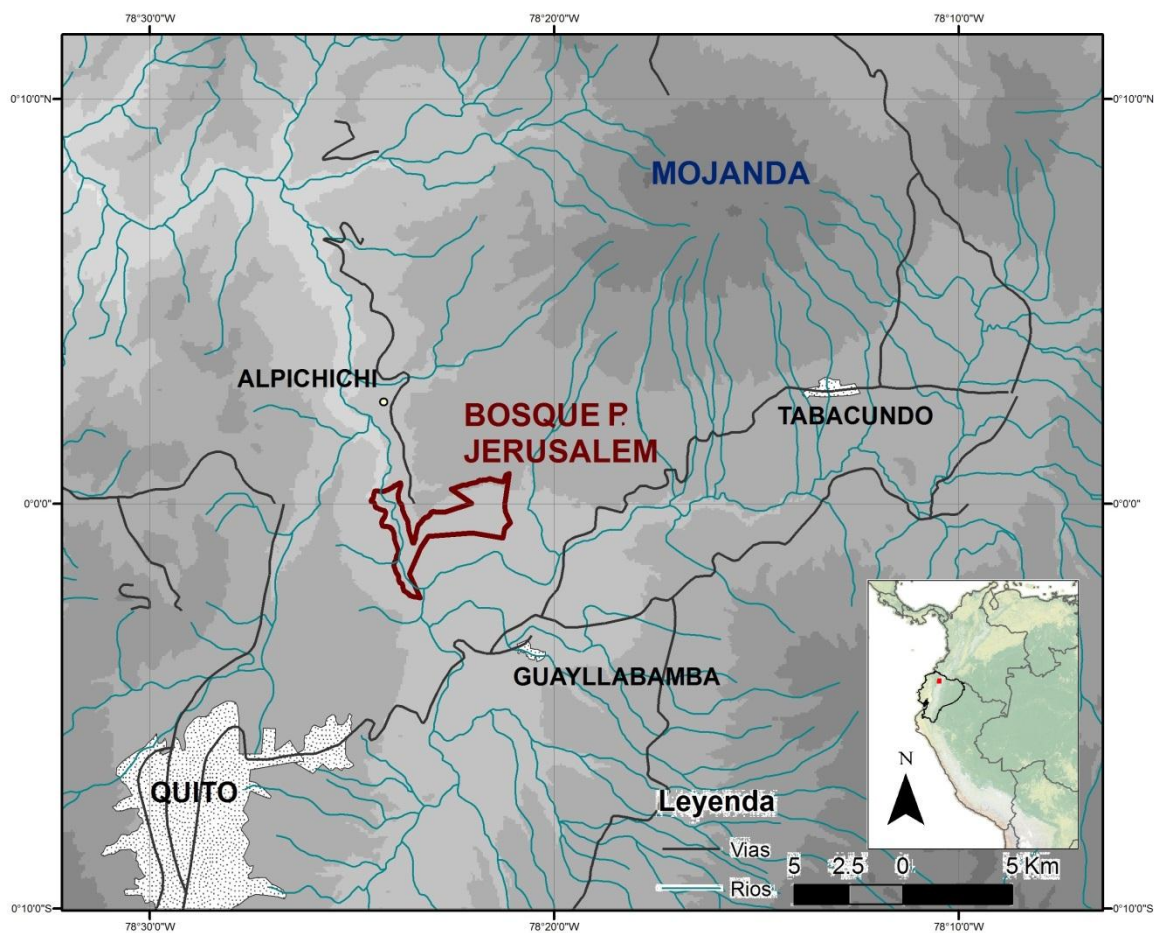
Zwickl, D.J. 2008. GARLI (Genetic algorithm for rapid likelihood inference). Versión 0.96. <http://www.bio.utexas.edu/faculty/antisense/garli/garli.html>.

## **10. FIGURAS**





**Figura 1.** Ciclo de vida de un haemosporidio: 1. Empieza por la transmisión del esporozoito al ave, cuando es picado por un vector; 2 Estos se desarrollan dentro de los tejidos del hospedero, tienen reproducción asexual (esquizogonia) y producen en merozoitos; 3. Estos invaden los eritrocitos, en *Plasmodium* continúan con la esquizogonia, en *Haemoproteus* se desarrollan en gametocitos; 4. Ocurre la gametogénesis y se producen gametos; 5. Se fusionan los gametos y forman cigotos fértiles, que eventualmente serán ingeridos por los vectores; 6. Estos se transforman en ookinetos y penetran a las células del intestino medio del vector; 7. Se produce esporogonia y los ooquistes desarrollan esporozoitos; 8. Los ooquistes maduros se instalan en las glándulas salivares del vector hasta una siguiente picadura (Modificado de: Atkinson y van Ripper III, 1991; Valkiūnas, 2005).

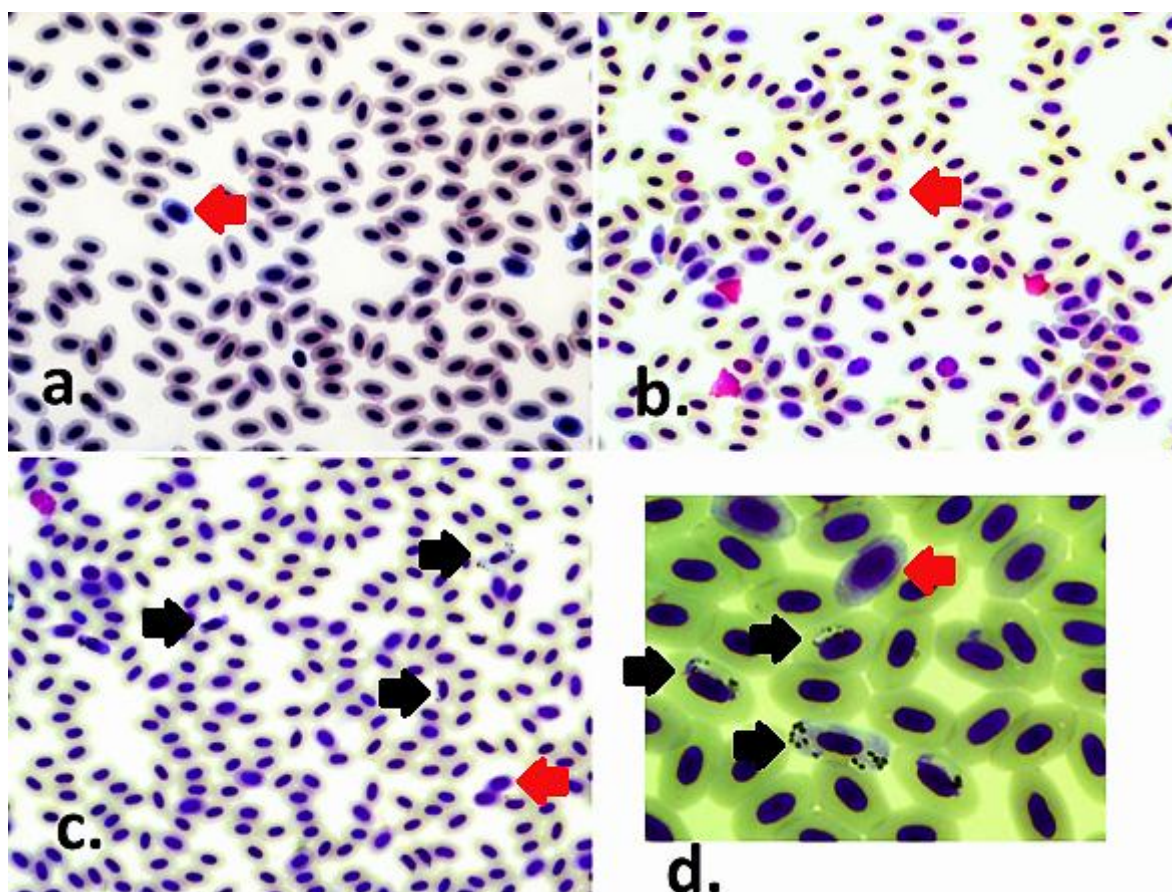


**Figura 2.** Ubicación geográfica del área de estudio: Bosque Protector Jerusalem, centro norte de Ecuador, en el valle Interandino de Río Guayllabamba (Preparado por Javier Nolla).

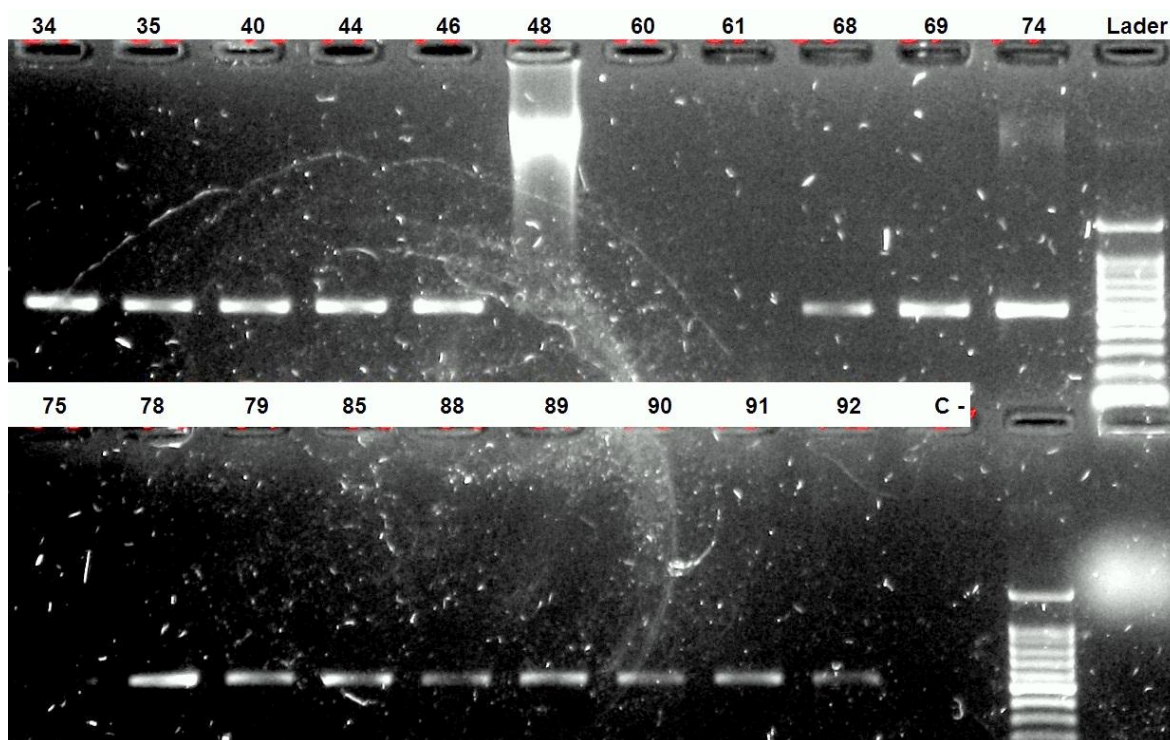


**Figura 3.** Trabajo de campo, en la mesa todos los materiales para tomar datos morfométricos, muestras de sangre, preparar frotis y anillar a las aves. El autor sentado con un ave en posición para extracción de sangre (Foto: Daniel Arias).





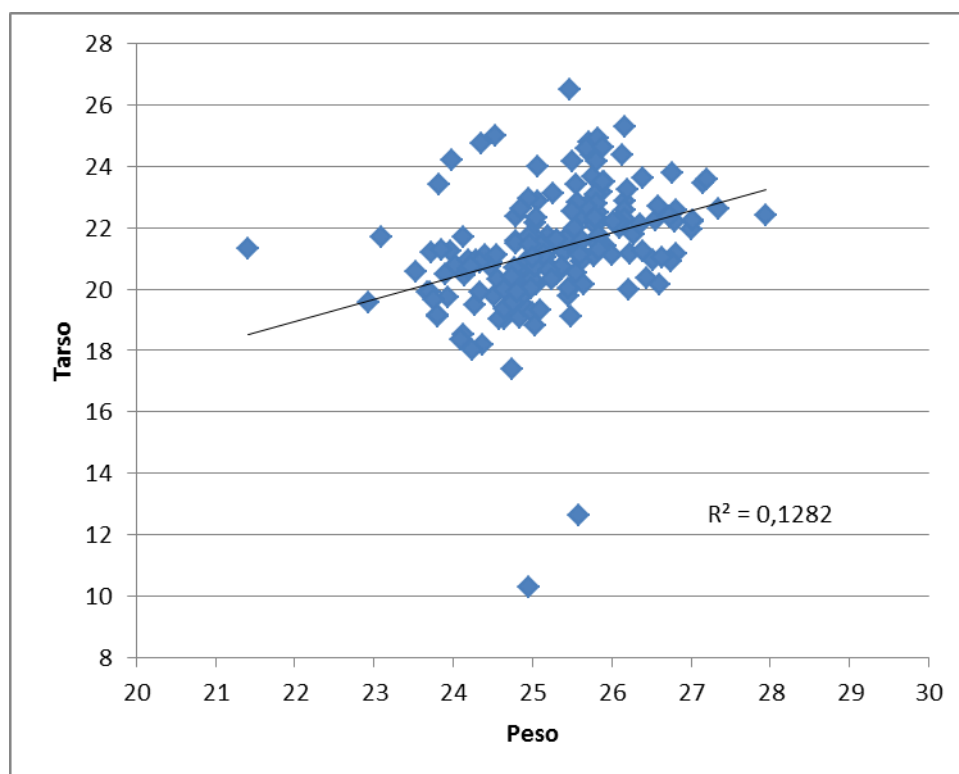
**Figura 4.** Frotis sanguíneos de Chingolo: a. Individuo HFC\_522 sin células infectadas; b. HFC\_645 individuo con el máximo conteo de policromatófilos = 2173; c. HFC\_549 individuo con el máximo conteo de células infectadas = 666, fotos en 40X; d. HFC\_549 en 100 X. Flechas rojas indican policromatófilos representativos en cada imagen, flechas negras algunas células infectadas en imágenes inferiores (Fotos H. Cadena).



**Figura 5.** Gel de agarosa al 1%, fotografiado en cámara de electroforesis. Números en rojo indican los números de campo sin el código numérico HFC, muestras positivas (34-46, 68-74, 78-92), muestras negativas (60,61,75), una muestra con error de amplificación (48) y el control negativo, cóctel de PCR sin muestra (c.) (Foto H. Cadena).

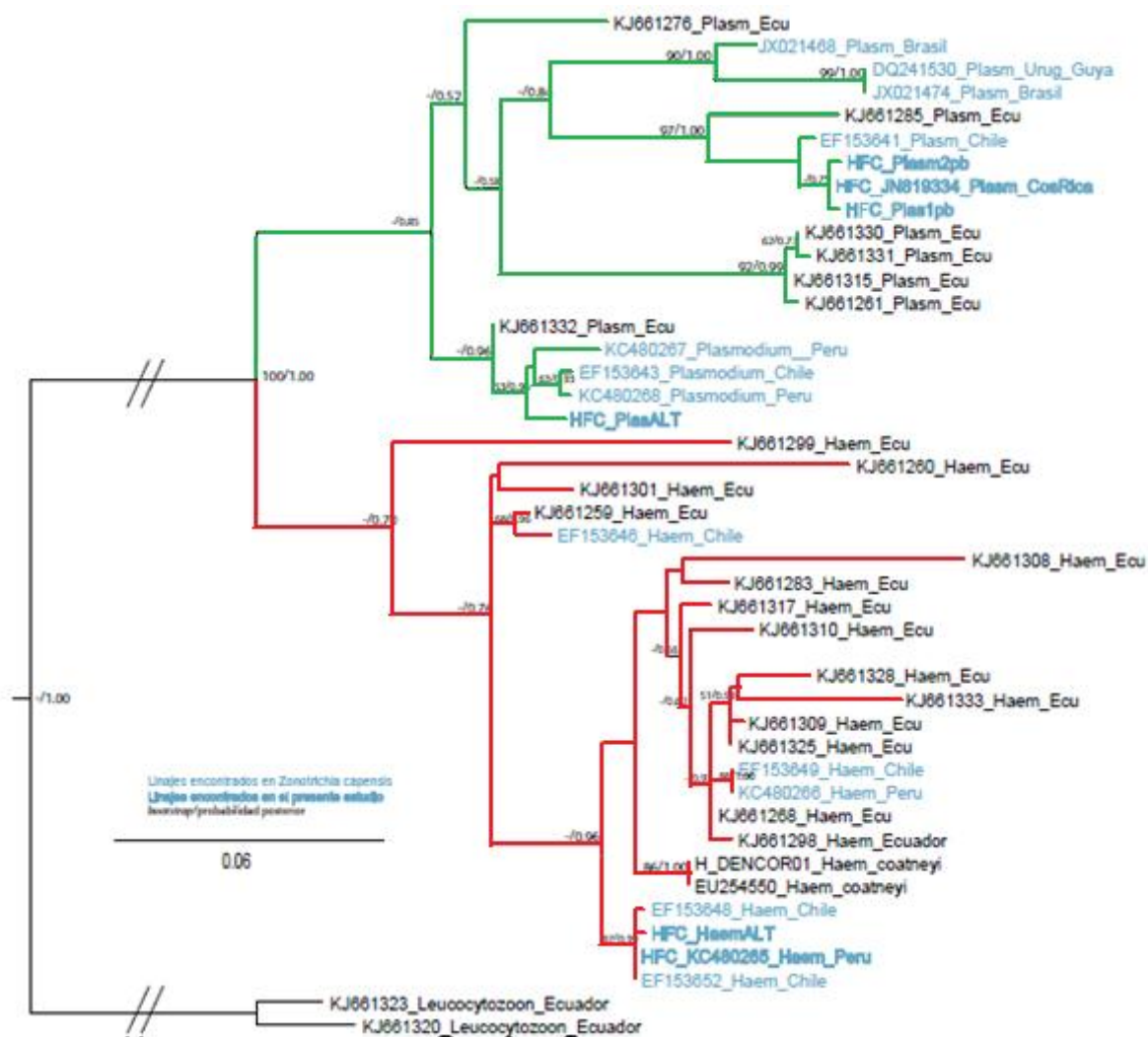


**Figura 6.** El hospedero Chingolo (*Zonotrichia capensis*), fotografía superior individuo adulto, fotografía inferior individuo juvenil (Fotos H. Cadena).



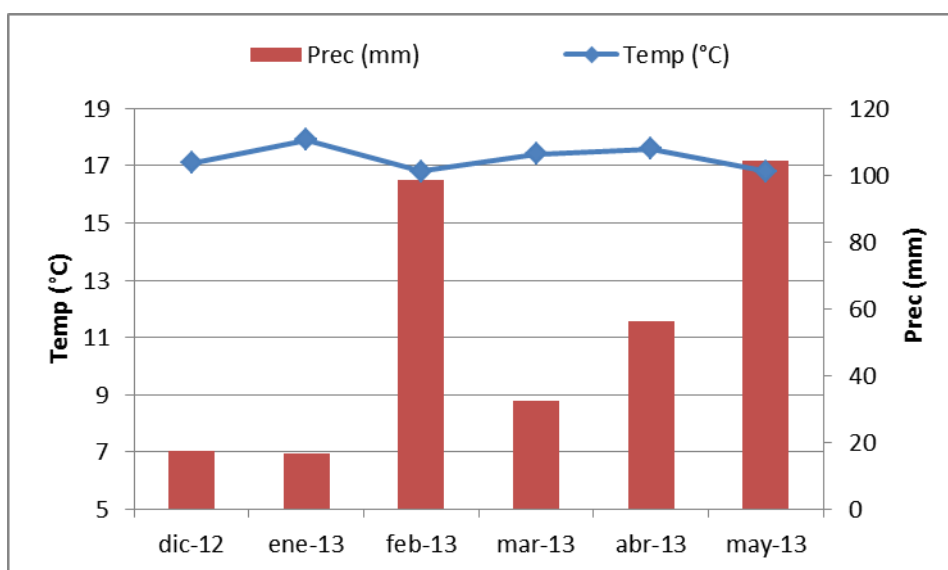
**Figura 7.** Condición física, regresión lineal entre tarso y peso para obtener los residuales que se emplearon como variables de condición física. En este análisis se puede observar que existe una relación lineal positiva entre el peso y el tarso.



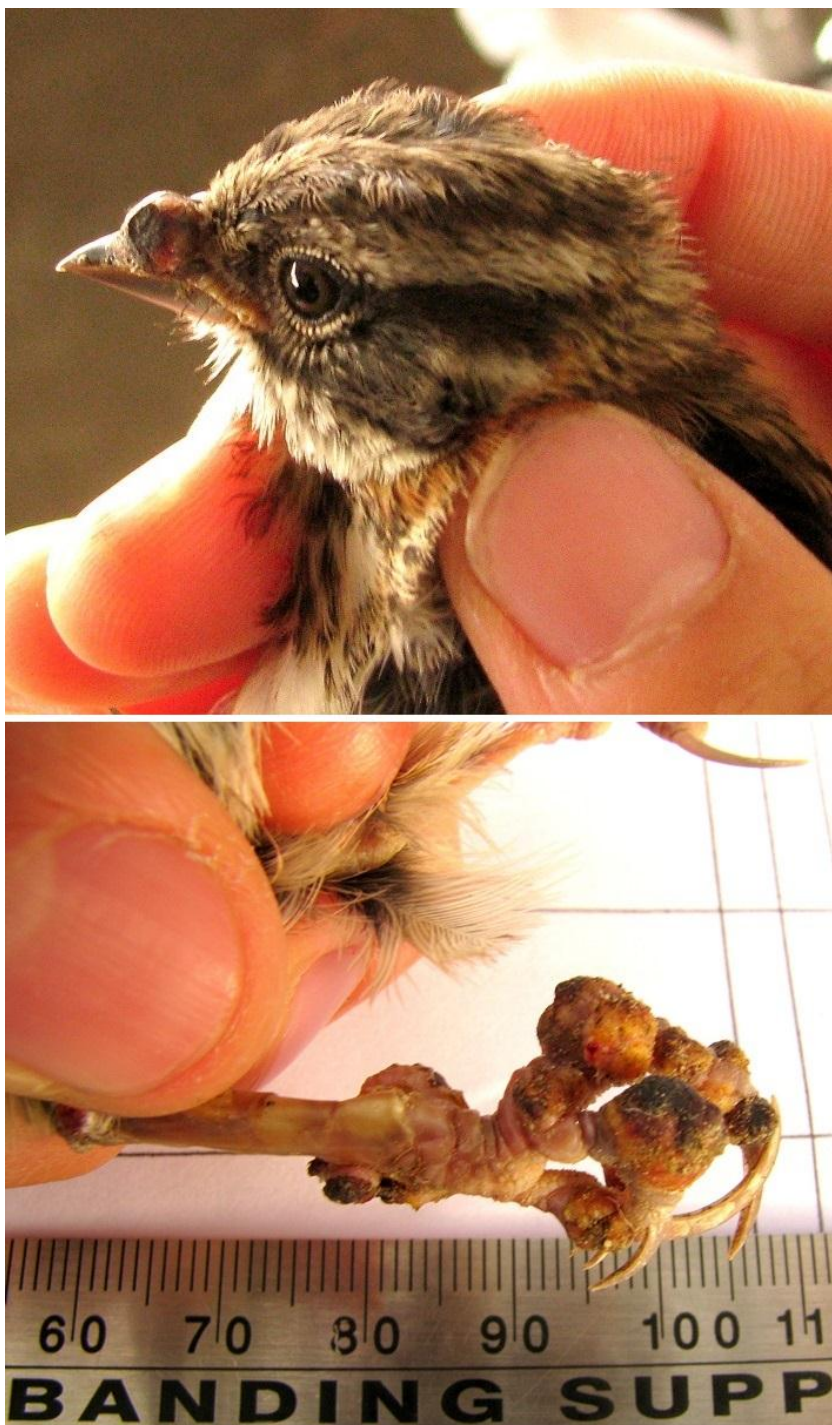


**Figura 8.** Árbol filogenético, incorpora los linajes encontrados en el Chingolo en el BPJ (con negrita y en azul); linajes previamente encontrados en el Chingolo en otros países (en azul) y linajes de haemosporidios encontrados en Ecuador de Harrigan *et al.*, 2014 (texto normal). En verde los linajes de *Plasmodium* y en rojo los de *Haemoproteus*. En cada rama se indica los valores de *bootstrap*/probabilidad posterior de haberlos.





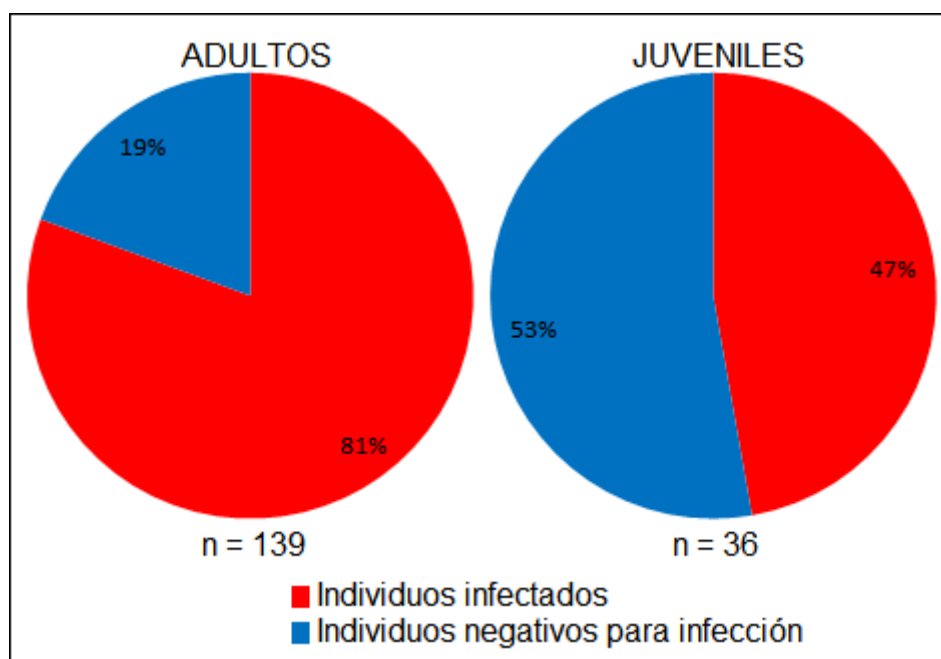
**Figura 9.** Climograma del BPJ en el periodo de muestreo, según datos provistos por el INAMHI de la estación climatológica La Victoria. Se evidencia la poca variación de la temperatura; la temporada seca de diciembre a enero y el resto temporada lluviosa.



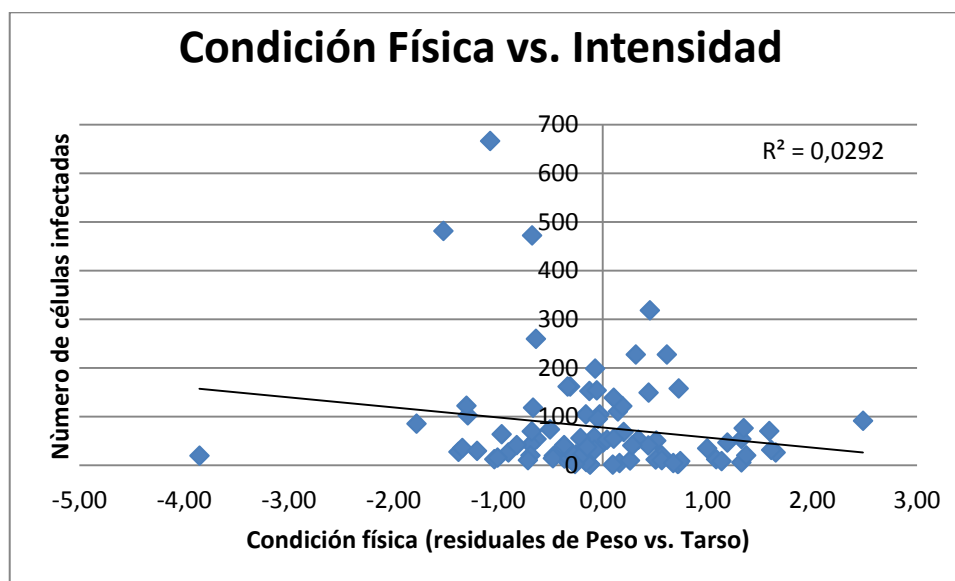
**Figura 10.** Chingolos con lesiones tipo Viruela Aviar: nótese en el individuo HFC\_788 (arriba) protuberancia en el pico y en el individuo HFC\_727 (abajo) varias protuberancias en su pata (Fotos H. Cadena).



**Figura 11.** Ectoparásitos encontrados en el Chingolo HFC\_698: arriba larvas en el área ventral del ave; abajo larvas ya extraídas (Fotos H. Cadena)

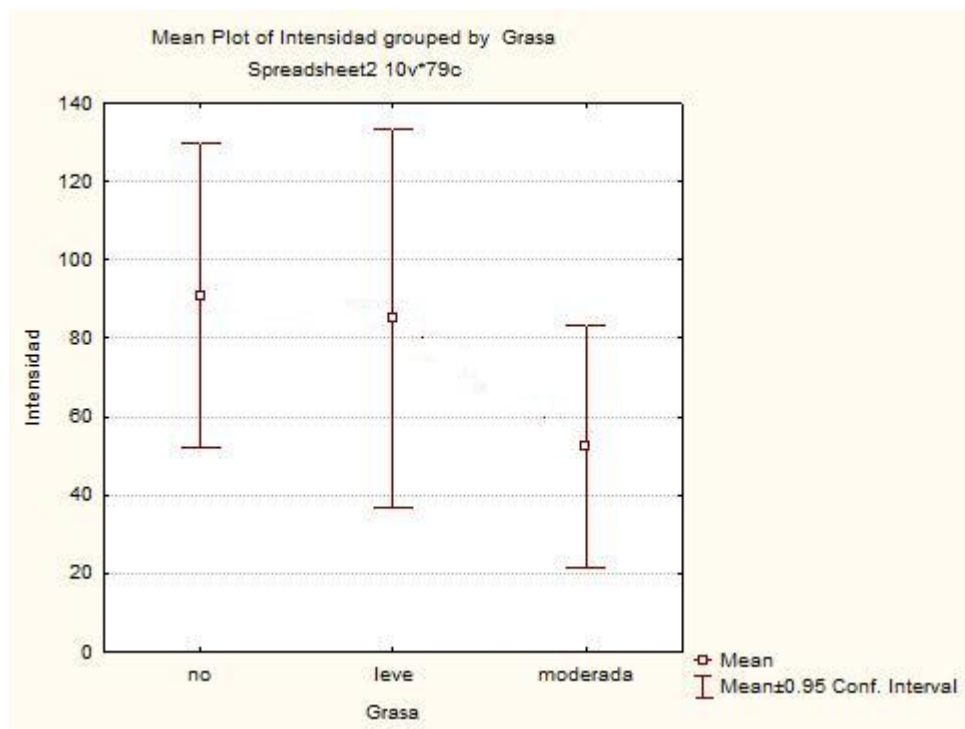


**Figura 12.** Porcentaje de individuos infectados según las edades del hospedero. A la izquierda se evidencia el mayor porcentaje de individuos adultos infectados en comparación al pastel de la derecha que indica los individuos juveniles de Chingolo.

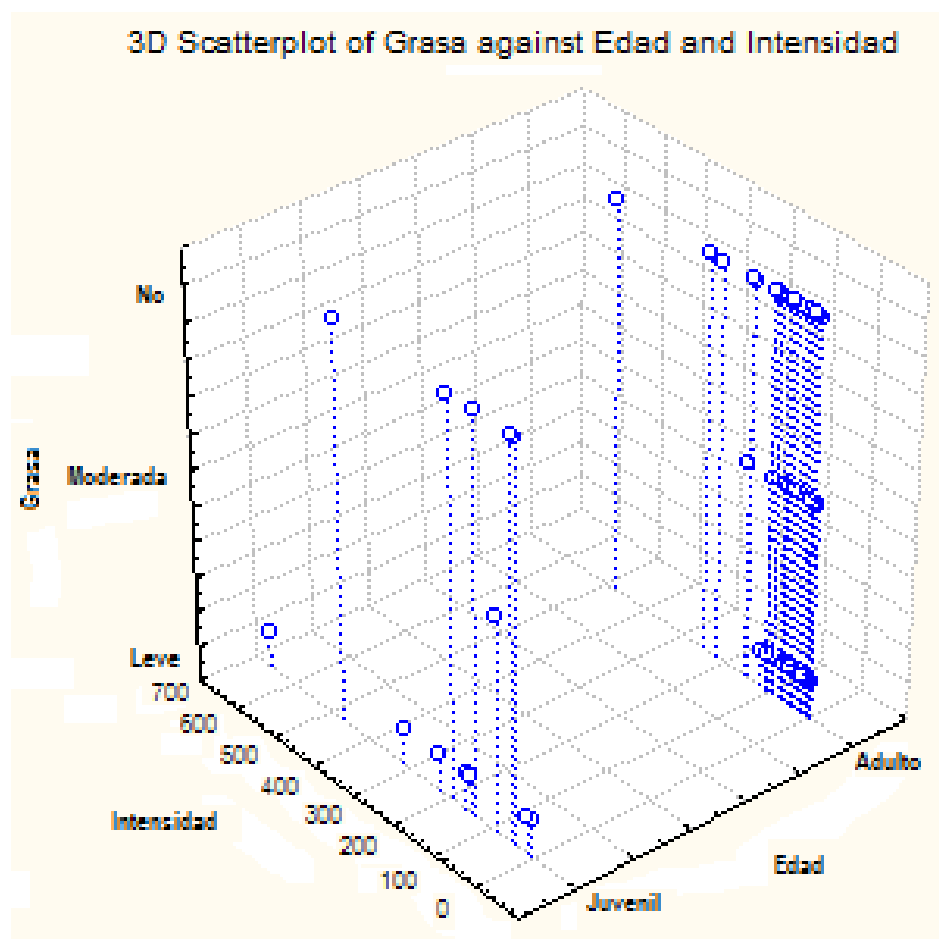


**Figura 13.** Relación entre intensidad de infección (número de células infectadas) y condición física; la línea de tendencia indica que a mejor condición física, hacia la derecha del eje X, menos células infectadas.





**Figura 14.** Intensidad de infección con relación a su cantidad de grasa corporal; los individuos que no evidenciaron grasa tienen un promedio de células infectadas de 85,40% ( $n = 40$ ), los de leve 81,55% ( $n = 33$ ) y en los de moderada 48,69% ( $n = 13$ ); los individuos con grasa leve presentan el mayor intervalo de confianza y se observa que a mayor cantidad de grasa menor intensidad de infección.



**Figura 15.** Intensidad de infección con respecto a la interacción grasa-edad; se puede interpretar que independientemente de la edad, los individuos con grasa moderada presentan baja intensidad de infección, también que la mayoría individuos adultos muestran bajas intensidades de infección, independientemente de la grasa.

## **11. TABLAS**



**Tabla 1.** Numero de muestras analizadas por cada método de diagnóstico de malaria aviar.

<b>Método</b>	<b>Muestras analizadas</b>	<b>Muestras de individuos recapturados</b>	<b>Muestras de individuos de primeras capturas</b>	<b>Resultados de individuos sin tomar en cuenta las recapturas</b>	
				<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>
<b>Microscopía</b>	119	11	108	86	22
<b>Molecular</b>	204	24	180	118	62

**Tabla 2.** Inconsistencias entre diagnósticos por microscopía y por análisis moleculares

<b>Iniciales</b>	<b>Infección general (positivo por microscopía y/o PCR)</b>	<b>Células infectadas</b>	<b>Diagnostico PCR</b>
HFC 022	+	3	-
HFC 060	+	4	-
HFC 120	+	42	-
HFC 159	+	0	+
HFC 270	+	12	-
HFC 283	+	2	-
HFC 317	+	19	-
HFC 328	+	0	+
HFC 335	+	52	-
HFC 427	+	6	-
HFC 430	+	73	-
HFC 431	+	104	-
HFC 434	+	110	-
HFC 436	+	35	-
HFC 437	+	11	-
HFC 441	+	19	-
HFC 443	+	54	-
HFC 448	+	10	-
HFC 460	+	12	-
HFC 567	-	0	no tiene
HFC 699	-	0	no tiene
HFC 781	+	76	-
HFC 831*	+	6	-
* Recaptura de HFC 638			

## **12. ANEXOS**

**Anexo 1.** Protocolo de tinción de placas con frotis sanguíneos mediante GIEMSA para poder visualizarlas en microscopio.

- 1) El mismo día de elaboración del frotis, fijar las placas con metanol 100% por aproximadamente 30 segundos.
- 2) Preparar buffer de 7,2 pH en 1 l de agua destilada agregar 1 g de fosfato de hidrógeno disódico y 0,7 g de dihidrógeno fosfato de potasio.
- 3) Añadir al 1 l de buffer anterior 10 ml de solución estándar GIEMSA.
- 4) Sumergir las placas en esta preparación, para su tinción por 1 hora a 20°C.
- 5) Transcurrido ese tiempo lavar las placas con agua y secar al aire libre.

**Anexo 2.** Protocolo de extracción de ADN con tiocianato de guanidina para muestras de sangre de aves - ExtADN01. El protocolo se lleva a cabo en 3 días.

DÍA 1:

**PRE-TRATAMIENTO PARA MUESTRAS DE SANGRE:**

- 1) Las muestras están en alcohol. Tomar 1 mL de la muestra, con la mayor cantidad posible de sangre suspendida en ellas y verter en tubos eppendorf de 1.5 mL opacos.
- 2) Centrifugar para que la sangre forme un pellet.
- 3) Retirar totalmente el alcohol por decantación o con la pipeta.

**LISIS CELULAR E INACTIVACIÓN DE NUCLEASAS:**

- 1) Calentar el Buffer de Lisis para disolver de nuevo el SDS (menos de 1 min en el microondas o a 55 °C en la estufa.
- 2) Añadir 300 µL de Buffer de Lisis.
- 3) Añadir 3 µL de una solución de proteinasa K (20 mg/mL). (La proteinasa K se encarga de denaturar las nucleasas y otras proteínas incrustadas en la membrana celular)
- 4) Mezclar con vortex y asegurarse de que todo el tejido esté en la solución. (Se puede dar una sacudida [*spin down*] para obligar a bajar pedazos de tejido que estén en las paredes).
- 5) Incubar las muestras a 55 °C con agitación 600 rpm hasta el día siguiente.

DÍA 2

**PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS:**

- 1) Añadir 4 µL de solución de RNAsa A y mezclar.
- 2) Añadir 100 µL de la Solución de Precipitación de Proteínas y mezclar con vórtex por 10-20 segundos.
- 3) Centrifugar por 10 min a 13000 rpm.
- 4) Decantar el sobrenadante en tubos de segunda fase (eppendorf de 1.5 mL transparentes) y descartar el resto.

#### 11.2.2.2. PRECIPITACIÓN DE ADN:

- 1) Añadir 300  $\mu$ L de isopropanol frío y mezclar con cuidado invirtiendo los tubos varias veces.
- 2) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min.
- 3) Descartar el sobrenadante.
- 4) Añadir 300  $\mu$ L de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el pellet.
- 5) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.
- 6) Dejar que el pellet se seque en el tubo, dejando éste abierto a temperatura ambiente.
- 7) Añadir 100  $\mu$ L de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 resuspender el pellet y guardar a 4 °C hasta el día siguiente.

#### DÍA 3

#### PRECIPITACIÓN Y LAVADO DEL ADN:

- 1) Añadir 10  $\mu$ L de NaOAc 3M y mezclar invirtiendo los tubos. (El acetado de sodio ayuda a precipitar el ADN).
- 2) Añadir 100  $\mu$ L de isopropanol frío y mezclar invirtiendo los tubos varias veces.
- 3) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.
- 4) Lavar el pellet con 300  $\mu$ L de etanol al 70% y mezclar invirtiendo los tubos.
- 5) Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.
- 6) Dejar que el pellet se seque en el tubo, dejando éste abierto a temperatura ambiente.
- 7) Re-suspender el pellet en 50  $\mu$ L de TE 0.1 M, pH 8.0.
- 8) Guardar a -20 °C.

**Anexo 3.** Composición del “coctel” de PCR y programa de amplificación.

## PCR A PARTIR DE DILUCIONES AL 50% DE ADN

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)	Concentración final
Agua		11.75	
Buffer	10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5	3 mM
dNTPs	10 mM	1	0.4 mM
Primer F	10 µM	1.5	0.6 µM
Primer R	10 µM	1.5	0.6 µM
Taq	5 U/µL	0.25	0.05 U/ µL
ADN		5	
TOTAL		25	

## PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94 °C	3'	X 1
Denaturación	94 °C	30''	X 37
Annealing	50 °C	30''	
Extensión	72 °C	45''	
Extensión final	72 °C	10'	X 1
	4 °C	∞	

## PCR A PARTIR DE PRODUCTOS DE PCR (PCR DE PCR)

Reactivo	Concentración	Volumen (μL)	Concentración final
Agua		18.25	
Buffer	10X	2.5	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5	3 mM
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Primer F	10 μM	0.5	0.2 μM
Primer R	10 μM	0.5	0.2 μM
Taq	5 U/μL	0.25	0.05 U/ μL
ADN		1	
<b>TOTAL</b>		<b>25</b>	

## PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR DE PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Denaturación inicial</b>	94 °C	3'	X 1
<b>Denaturación</b>	94 °C	30"	X 20
<b>Annealing</b>	50 °C	30"	
<b>Extensión</b>	72 °C	45"	
<b>Extensión final</b>	72 °C	10'	X 1
	4 °C	∞	



**Anexo 4.** Linajes de haemoparásitos encontradas en el Chingolo (*Zonotrichia capensis*), obtenidas de Genbank; con información de otros hospederos obtenida de las respectivas referencias bibliográficas; Taxonomía actualizada según Remsen *et al.* (2014).

Número de accesión	Género	Referencia	País	Otro hospederos
KC480265	<i>Haemoproteus</i>	Jones <i>et al.</i> , 2013	Perú	No hay información
KC480266	<i>Haemoproteus</i>	Jones <i>et al.</i> , 2013	Perú	No hay información
KC480267	<i>Plasmodium</i>	Jones <i>et al.</i> , 2013	Perú	No hay información
KC480268	<i>Plasmodium</i>	Jones <i>et al.</i> , 2013	Perú	No hay información
DQ241530	<i>Plasmodium</i>	Durrant <i>et al.</i> , 2006	Uruguay	Furnariidae ( <i>Cranioleuca pyrrhophia</i> ), Icteridae ( <i>Gnorimopsar chopi</i> ) y Parulidae ( <i>Basileuterus culicivorous</i> y <i>Myiothlypis leucoblephara</i> )
DQ241530	<i>Plasmodium</i>	Durrant <i>et al.</i> , 2006	Guyana	Thraupidae ( <i>Volatina jacarina</i> ), Icteridae ( <i>Cacicus cela</i> y <i>C. haemorrhous</i> ) y Psittacidae ( <i>Diopsittaca nobilis</i> )

*Continúa pag. siguiente*

Número de accesión	Género	Referencia	País	Otro hospederos
JX021468	<i>Plasmodium</i>	Lacorte <i>et al.</i> , 2013	Brasil	Furnariidae ( <i>Anabazenops fuscus</i> ), Thraupidae ( <i>Trichothraupis melanops</i> ) y Vireonidae ( <i>Vireo olivaceus</i> )
JX021474	<i>Plasmodium</i>	Lacorte <i>et al.</i> , 2013	Brasil	Parulidae ( <i>Myiothlypis flaveola</i> ), Troglodytidae ( <i>Cantorchilus longirostris</i> ), Thamnophilidae ( <i>Formicivora melanogaster</i> ) Tityridae ( <i>Pachyramphus polychopterus</i> ), Parulidae ( <i>Setophaga pitiayumi</i> ), Thraupidae ( <i>Trichothraupis melanops</i> y <i>Coereba flaveola</i> ) y Turdidae ( <i>Turdus leucomelas</i> y <i>T. rufiventris</i> )
EF153646	<i>Haemoproteus</i>	Merino <i>et al.</i> , 2008	Chile	Furnariidae ( <i>Aphrastura spinicauda</i> ), Tyrannidae ( <i>Elaenia albiceps</i> ), Trochilidae ( <i>Sephanoides sephanoides</i> ), Troglodytidae ( <i>Troglodytes musculus</i> )
EF153646	<i>Haemoproteus</i>	Merino <i>et al.</i> , 2008	Chile	Furnariidae ( <i>Aphrastura spinicauda</i> ), Tyrannidae ( <i>Elaenia albiceps</i> ), Trochilidae ( <i>Sephanoides sephanoides</i> ), Troglodytidae ( <i>Troglodytes musculus</i> )

Viene de pag. 70, continúa pag. siguiente

Número de accesión	Género	Referencia	País	Otro hospederos
EF153652	<i>Haemoproteus</i>	Merino <i>et al.</i> , 2008	Chile	Troglodytidae ( <i>Troglodytes musculus</i> ), Tyrannidae ( <i>Elaenia albiceps</i> ), Turdidae ( <i>Turdus falcklandii</i> ), Furnaridae ( <i>Aphrastura spinicauda</i> )
EF153648 y EF153649	<i>Haemoproteus</i>	Merino <i>et al.</i> , 2008	Chile	sólo en <i>Zonotrichia capensis</i>
EF153641	<i>Plasmodium</i>	Merino <i>et al.</i> , 2008	Chile	Turdidae ( <i>Turdus falcklandii</i> ), Troglodytidae ( <i>Troglodytes musculus</i> ), Tyrannidae ( <i>Elaenia albiceps</i> )
EF153643	<i>Plasmodium</i>	Merino <i>et al.</i> , 2008	Chile	Furnaridae ( <i>Aphrastura spinicauda</i> ), Tyrannidae ( <i>Elaenia albiceps</i> ).

Viene de pag. 70

**Anexo 5.** Número de individuos capturados por especie y sus recapturas durante toda la fase de campo, taxonomía actualizada según Remsen *et al.*, 2014 (previamente presentado en Bahamonde, 2014).

No.	Especie	Número de Individuos	Numero de recapturas
1	<i>Columbina passerina</i>	107	18
2	<i>Leptotila verreauxi</i>	2	0
3	<i>Systellura longirostris</i>	1	0
4	<i>Colibri coruscans</i>	38	0
5	<i>Lesbia victoriae</i>	17	0
6	<i>Patagona gigas</i>	3	0
7	<i>Myrtis fanny</i>	37	0
8	<i>Chaetocercus mulsant</i>	2	0
9	<i>Chlorostilbon melanorhynchus</i>	15	0
10	<i>Amazilia tzacatl</i>	13	0
11	<i>Piculus rivolii</i>	6	0
12	<i>Synallaxis azarae</i>	5	0
13	<i>Elaenia albiceps</i>	10	0
14	<i>Camptostoma obsoletum</i>	9	0

Continúa pag. siguiente

No.	Especie	Número de Individuos	Numero de recapturas
15	<i>Anairetes parulus</i>	3	0
16	<i>Myiophobus fasciatus</i>	3	0
17	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	32	4
18	<i>Myiotheretes striaticollis</i>	1	0
19	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i>	7	0
20	<i>Troglodytes aedon</i>	31	11
21	<i>Thraupis bonariensis</i>	21	2
22	<i>Thraupis episcopus</i>	2	2
23	<i>Tangara vitriolina</i>	32	19
24	<i>Conirostrum cinereum</i>	26	8
25	<i>Diglossa sittoides</i>	11	0
26	<i>Phrygilus plebejus</i>	91	22
27	<i>Sporophila nigricollis</i>	8	2
28	<i>Sporophila sp.</i>	1	0
29	<i>Catamenia analis</i>	31	2
30	<i>Euphonia cyanocephala</i>	12	1

Viene de pag. 73, continúa pag. siguiente

No.	Especie	Número de Individuos	Numero de recapturas
31	<i>Tiaris olivácea</i>	2	1
32	<i>Tiaris obscurus</i>	5	3
33	<i>Saltator striatipectus</i>	26	7
34	<i>Zonotrichia capensis</i>	226	48
35	<i>Pheucticus chrysogaster</i>	14	0
36	<i>Sporagra magellanica</i>	66	9

---

*Viene de pag. 73.*

**Anexo 6.** Conteo de fortis sanguíneos. Para las recapturas junto al número de campo se pone el número de campo de su respectiva captura inicial.

Número de campo	Fecha de captura	Eritrocitos sanos (#)	Policromatófilos (#)	Eritrocitos infectados (#)	Eritrocitos infectados (%)
HFC 003	02/12/2012	9390	564	46	0,46
HFC 010	02/12/2012	9349	598	53	0,53
HFC 020	02/12/2012	8961	1012	27	0,27
HFC 022	02/12/2012	9319	678	3	0,03
HFC 034	03/12/2012	9340	655	5	0,05
HFC 035	03/12/2012	9188	766	46	0,46
HFC 040	03/12/2012	8629	1267	104	1,04
HFC 044	03/12/2012	9199	710	91	0,91
HFC 046	09/12/2012	8978	969	53	0,53
HFC 060	09/12/2012	9469	527	4	0,04
HFC 096	16/12/2012	9090	683	227	2,27
HFC 118	16/12/2012	9226	748	26	0,26
HFC 120	16/12/2012	9064	894	42	0,42
HFC 144	16/12/2012	9007	836	157	1,57
HFC 145	16/12/2012	9272	660	68	0,68
HFC 159	17/12/2012	9569	431	0	0
HFC 172	27/12/2012	9350	548	102	1,02
HFC 188	27/12/2012	8949	1031	20	0,2
HFC 204	10/01/2013	9114	873	13	0,13
HFC 265	12/01/2013	9531	412	57	0,57
HFC 270	13/01/2013	9584	404	12	0,12
HFC 279	13/01/2013	9307	641	52	0,52
HFC 281	13/01/2013	9174	799	27	0,27
HFC 283	19/01/2013	9555	443	2	0,02
HFC 285	19/01/2013	8768	1230	2	0,02
HFC 308	19/01/2013	9367	472	161	1,61
HFC 315	19/01/2013	9494	465	41	0,41
HFC 316	20/01/2013	9340	660	0	0
HFC 317	20/01/2013	9450	531	19	0,19
HFC 318	20/01/2013	9050	949	1	0,01
HFC 325	20/01/2013	9445	505	50	0,5
HFC 327	26/01/2013	9248	726	26	0,26
HFC 328	26/01/2013	9226	774	0	0
HFC 335	26/01/2013	9413	535	52	0,52
HFC 354	26/01/2013	8821	1057	122	1,22
HFC 366	27/01/2013	9238	753	9	0,09

*Continúa pag. siguiente*

Número de campo	Fecha de captura	Eritrocitos sanos (#)	Policromatófilos (#)	Eritrocitos infectados (#)	Eritrocitos infectados (%)
HFC 405	09/02/2013	8620	1358	22	0,22
HFC 406	09/02/2013	9567	433	0	0
HFC 410	09/02/2013	9467	533	0	0
HFC 413	09/02/2013	9437	562	1	0,01
HFC 416	09/02/2013	9445	555	0	0
HFC 427	09/02/2013	9399	595	6	0,06
HFC 430	09/02/2013	8522	1405	73	0,73
HFC 431	09/02/2013	9235	661	104	1,04
HFC 432	10/02/2013	9257	743	0	0
HFC 434	10/02/2013	9599	291	110	1,1
HFC 436	10/02/2013	9308	657	35	0,35
HFC 437	10/02/2013	8626	1363	11	0,11
HFC 441	10/02/2013	9327	654	19	0,19
HFC 443	10/02/2013	8908	1038	54	0,54
HFC 448	10/02/2013	9339	651	10	0,1
HFC 460	11/02/2013	8890	1098	12	0,12
HFC 468	11/02/2013	9493	507	0	0
HFC 472	11/02/2013	8754	1232	14	0,14
HFC 524	09/03/2013	8974	874	152	1,52
HFC 549	10/03/2013	8507	827	666	6,66
HFC 551	16/03/2013	9466	503	31	0,31
HFC 552	16/03/2013	9148	852	0	0
HFC 553	16/03/2013	9265	727	8	0,08
HFC 567	16/03/2013	9554	446	0	0
HFC 568	17/03/2013	8700	1300	0	0
HFC 570	17/03/2013	8072	1858	70	0,7
HFC 578	28/03/2013	9338	622	40	0,4
HFC 597	28/03/2013	9095	891	14	0,14
HFC 605	29/03/2013	8780	1200	20	0,2
HFC 606	29/03/2013	9288	693	19	0,19
HFC 619	30/03/2013	9348	632	20	0,2
HFC 624	30/03/2013	9261	684	55	0,55
HFC 629	30/03/2013	7887	2105	8	0,08
HFC 638	30/03/2013	9298	687	15	0,15
HFC 645	31/03/2013	7790	2173	37	0,37
HFC 649	31/03/2013	8778	904	318	3,18
HFC 660	06/04/2013	9254	585	161	1,61
HFC 663	06/04/2013	9325	526	149	1,49
HFC 685	13/04/2013	8286	1710	4	0,04
HFC 689	13/04/2013	9388	612	0	0

*Viene de pag. 76, continúa pag. siguiente*



Número de campo	Fecha de captura	Eritrocitos sanos (#)	Policromatófilos (#)	Eritrocitos infectados (#)	Eritrocitos infectados (%)
HFC 690	13/04/2013	9012	948	40	0,4
HFC 694	13/04/2013	8751	1249	0	0
HFC 696	13/04/2013	9414	557	29	0,29
HFC 698	14/04/2013	8747	1212	41	0,41
HFC 699	14/04/2013	8946	1054	0	0
HFC 705	14/04/2013	8360	1609	31	0,31
HFC 712	14/04/2013	9097	840	63	0,63
HFC 727	21/04/2013	8368	1434	198	1,98
HFC 735	21/04/2013	9199	801	0	0
HFC 736	21/04/2013	8547	972	481	4,81
HFC 737	21/04/2013	8837	904	259	2,59
HFC 739	21/04/2013	9107	873	20	0,2
HFC 750	27/04/2013	9515	416	69	0,69
HFC 751	27/04/2013	9314	686	0	0
HFC 763	26/05/2013	9156	691	153	1,53
HFC 766	26/05/2013	9423	482	95	0,95
HFC 781	28/05/2013	9381	543	76	0,76
HFC 787	28/05/2013	9325	675	0	0
HFC 789	28/05/2013	9064	936	0	0
HFC 800	28/05/2013	9126	874	0	0
HFC 807	29/05/2013	9029	971	0	0
HFC 813	05/06/2013	9238	641	121	1,21
HFC 818	05/06/2013	9303	695	2	0,02
HFC 822	05/06/2013	9027	855	118	1,18
HFC 824	05/06/2013	8552	1448	0	0
HFC 826	05/06/2013	8274	1716	10	0,1
HFC 830	06/06/2013	9171	829	0	0
HFC 832	06/06/2013	9037	825	138	1,38
HFC 833	06/06/2013	8629	1144	227	2,27
HFC 835	06/06/2013	8905	623	472	4,72
HFC 836	06/06/2013	9088	827	85	0,85
HFC 854	07/06/2013	8525	1441	34	0,34
HFC 400 / HFC 204	03/02/2013	9032	919	49	0,49
HFC 444 / HFC 265	10/02/2013	9008	900	92	0,92
HFC 447 / HFC 354	10/02/2013	8793	1082	125	1,25

*Viene de pag. 76, continúa pag. siguiente*

<b>Número de campo</b>	<b>Fecha de captura</b>	<b>Eritrocitos sanos (#)</b>	<b>Policromatófilos (#)</b>	<b>Eritrocitos infectados (#)</b>	<b>Eritrocitos infectados (%)</b>
HFC 500 / HFC 335	23/02/2013	9336	652	12	0,12
HFC 513 / HFC 366	24/02/2013	9261	738	1	0,01
HFC 692 / HFC 406	13/04/2013	9488	512	0	0
HFC 700 / HFC 443	14/04/2013	8541	1454	5	0,05
HFC 749 / HFC 689	27/04/2013	9524	476	0	0
HFC 786 / HFC 698	28/05/2013	8406	1588	6	0,06
HFC 810 / HFC 685	29/05/2013	8021	1945	34	0,34
HFC 831 / HFC 638	06/06/2013	9365	629	6	0,06

*Viene de pag. 76.*

**Anexo 7.** Secuencias de haemoparásitos encontrados en los Chingolos del BPJ, en rojo se marcan las bases que difieren dentro de los géneros.

HFC\_826\_Plas2pb

CATTTGTATTTATTCTAACATATTTACATATTTTAAAGAGGATTAAATTATTCTTA  
TTCTTATTTACCTTTATCATGGATATCAGGATTAATAATATTTTAAATATCAATA  
GTTACTGCTTTTATGGGATATGTACTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGT  
GCAACCGTCATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGTCTTGTTTCATGGATCT  
GTGGTGGATATCTTGTAAGCGACCCAACATTAAAAAGATTTTTGTATTACATT  
TTATATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTCTACA  
TTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTT  
CTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAAGGATTTAATAATATCTTAG

HFC\_JN819334\_Plasm\_CosRica

CATTTGTATTTATTCTTACATATTTACATATTTTAAAGAGGATTAAATTATTCTTA  
TTCTTATTTACCTTTATCATGGATATCAGGATTAATAATATTTTAAATATCAATA  
GTTACTGCTTTTATGGGATATGTACTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGT  
GCAACCGTCATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGTCTTGTTTCATGGATCT  
GTGGTGGATATCTTGTAAGCGACCCAACATTAAAAAGATTTTTGTATTACATT  
TTATATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTCTACA  
TTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTT  
CTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAAGGATTTAATAATATCTTAGTTTT  
ATTTTATAGCACAAAGCTTAT

HFC\_690\_Plas1pb

CATTTGTATTTATTCATACATATTTACATATTTTAAAGAGGATTAAATTATTCTTA  
TTCTTATTTACCTTTATCATGGATATCAGGATTAATAATATTTTAAATATCAATA  
GTTACTGCTTTTATGGGATATGTACTACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGT  
GCAACCGTCATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGTCTTGTTTCATGGATCT  
GTGGTGGATATCTTGTAAGCGACCCAACATTAAAAAGATTTTTGTATTACATT  
TTATATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTCTACA  
TTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTT  
CTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATATTAAAGGATTTAATAATATCTTAGTTTT  
ATTTTATAGCACAAAGCTTAT

HFC\_839\_PlasALT

CATTTGTATTTATTTTAACATTATTTACATATTTTAAAGAGGATTAAATTATTCATA  
TTCATATTTACCTTTATCATGGATATCTGGATTACTTATATTTTAAATATCTATT  
GTAACAGCTTTTATGGGTTATGTAATACCTTGGGGTCAAATGAGTTTCTGGGGT  
GCTACAGTTATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTTCATGGATAT  
GTGGTGGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTAAAAAGATTCTTTGTATTACATT  
TTACATTTCCATTTATAGCCTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTTTACA  
TTTACAAGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCTTTAAAAATACCCTT  
CTATCCAAATCTTTAAGTCTTGATATTAAAGGATTTAATAATGTATTAGTATT  
ATTCTTAGCACAAAGTTTAT

## HFC\_HaemALT

CATTTGTCCTTTATTTTAACTTACTTACATATATTAAGAGGATTAAATTATTCATA  
TTCTTATTTACCTTTATCATGGATAACTGGACTAATAATATTCTTAATTTCTATT  
GTTACCGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGACAAATGAGTTTCTGGGGT  
GCAACCGTTATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTTCATGGATTT  
GTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTAAAAAGATTTTTTGTACTACATT  
TTATATTTTCCTTTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTCTTACAC  
TTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCTTTC  
TATCCAAGTCTATTATGTCTAGATATCAAAGGATTTAATAATGTATTA<sup>T</sup>TCCTA  
TTTCTAGCACAAAGTTTAT

## HFC\_KC480265\_Haem\_Peru

CATTTGTCCTTTATTTTAACTTACTTACATATATTAAGAGGATTAAATTATTCATA  
TTCTTATTTACCTTTATCATGGATAACTGGACTAATAATATTCTTAATTTCTATT  
GTTACCGCTTTTATGGGTTATGTATTACCTTGGGGACAAATGAGTTTCTGGGGT  
GCAACCGTTATTACTAATTTATTATATTTTATACCTGGACTTGTTTCATGGATTT  
GTGGAGGATATACTATTAGTGATCCAACCTTAAAAAGATTTTTTGTACTACATT  
TTATATTTTCCTTTTATAGCTTTATGTATTGTATTTATACATATATTCTTCTTACAC  
TTACAAGGTAGCTCTAATCCTTTAGGATATGATACAGCTTTAAAAATACCTTTC  
TATCCAAGTCTATTATGTCTAGATATCAAAGGATTTAATAATGTATTA<sup>G</sup>TCCTA  
TTTCTAGCACAAAGTTTAT

**Anexo 8.** Comparación de linajes de haemoparásitos encontradas en el Chingolo (*Zonotrichia capensis*) con las previamente reportadas en Genbank.

Linaje encontrado	Género	No. Individuos infectados	% de similitud	Linaje reportado	Hospedero	País	Referencia
HFC_Plasm2pb	Plasmodium	1	99	KF537291	<i>Zonotrichia capensis</i>	Colombia	Gonzalez <i>et al.</i> 2015
HFC_JN819334_Plasma_CosRica	Plasmodium	37	n.a.	JN819334	<i>Tangara icterocephala</i>	Costa Rica	Archer <i>et al.</i> , datos no publicados
HFC_Plas1pb	Plasmodium	2	99	KF537288	<i>Basileuterus coronatus</i>	Colombia	Gonzalez <i>et al.</i> 2015
HFC_PlasALT	Plasmodium	2	99	KC867656	n.a.	Ecuador	Levin <i>et al.</i> , 2013
HFC_HaemALT	Haemoproteus	2	99	KC480265	<i>Zonotrichia capensis</i>	Perú	Jones <i>et al.</i> , 2013
HFC_KC480265_Haem_Peru	Haemoproteus	81	n.a.	KC480265	<i>Zonotrichia capensis</i>	Perú	Jones <i>et al.</i> , 2013

